

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudios de inmunidad de base celular e inmunopatología en  
la peste porcina africana**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**J. M. Sanchez-Vizcaino**

DIRECTOR:

**Carlos Sánchez Botija**

**Madrid, 2015**

TP  
1982  
0440

José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez



\* 5 3 0 9 8 6 3 0 4 1 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

x-52-1242-4

ESTUDIOS DE INMUNIDAD DE BASE CELULAR E INMUNOPATOLOGIA  
EN LA PESTE PORCINA AFRICANA

Departamento de Enfermedades infecciosas  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid  
1984



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº 40/84

© José Manuel Sánchez-Vizcaíno Rodríguez  
Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3 Madrid-8  
Madrid, 1984  
Xerox 9200 XB 480  
Depósito Legal: M-4036-1984

AUTOR: JOSE MANUEL SANCHEZ-VIZCAINO RODRIGUEZ

ESTUDIOS DE INMUNIDAD DE BASE CELULAR E  
INMUNOPATOLOGIA EN LA PESTE PORCINA AFRICANA.

DIRECTOR: CARLOS SANCHEZ BOTIJA

CATEDRATICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS JEFE DEL DEPARTAMENTO DE  
VIROLOGIA ANIMAL DEL INIA.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

1982



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA

Memoria que presenta para la co-  
lación del grado de Doctor en Ve-  
terinaria el Licenciado José Ma-  
nuel Sánchez-Vizcaino Rodríguez.

*Sánchez-Vizcaino*

Esta tesis doctoral ha sido  
realizada en el Departamen-  
to de Virología Animal del  
Instituto Nacional de Inves-  
tigaciones Agrarias bajo la  
dirección del Profesor Dr.  
Carlos Sánchez Botija.

*Carlos Sánchez Botija*

Madrid, 1982



" Una teoría es eficiente mientras se utilice como hipótesis de trabajo que estimule y genere Investigación. En cuanto se transforma en Dogma se convierte en un Factor Negativo".

OSIAS STUTMAN

Para todos los que en forma de antígenos idóneos me habéis estimulado en la realización de este trabajo, agradeciendooos la ayuda prestada así como el tiempo robado, especialmente a Carmen y Laura. A todos - vosotros también pertenece parte de este trabajo que espero no se convierta en Dogma.





## AGRADECIMIENTO

Al Profesor Dr. Carlos Sánchez Botija, no solo por la enorme ayuda prestada para la realización de este trabajo, sino - sobre todo por su apoyo, sus consejos, y la confianza que me brindó durante mis primeros años profesionales, años generalmente difíciles para todo el que empieza. Por todo ello, muchísimas gracias.

A mi querido grupo Suat Immunology porque sin su ayuda hubiera sido imposible llevar a cabo estos experimentos.

A los Drs. E. Carmichael, y R. Schultz de la Universidad de Cornell (USA). Que me enseñaron muchas cosas, sin recelos, intrigas ó tapujos. El que de verdad sabe, no teme enseñar.

A. Dr. David O. Slauson de la Universidad de Cornell - (USA) por su inestimable ayuda en los trabajos de inmunopatología, auténtico colaborador de estos estudios.

A los Drs. Jerry Callis y Charles Mebus del Plum Island Animal Disease Center de Nueva York por facilitarme los cerdos "gnotobióticos" y sus laboratorios donde realicé parte de estos trabajos.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias al que debo una parte importante de mi formación científica, así como su apoyo en todos mis posteriores proyectos.

A Rosa Mary por mecanografiar y componer esta tesis.

Finalmente, aunque no en último lugar, a mis queridos animales de experimentación, auténticos héroes de la ciencia.



# I

## INDICE

=====

I. INTRODUCCION.	<u>Pág</u>
I.1. IMPORTANCIA DE LA PPA .....	1
I.2. ETIOLOGIA DE LA PPA .....	5
I.3. INMUNIDAD DE LA PPA .....	7
I.4. OBJETIVO Y JUSTIFICACION .....	11
II. MATERIAL Y METODOS.	
II.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION .....	18
II.2. REACTIVOS .....	20
II.3. SOLUCIONES QUIMICAS .....	22
II.4. ACCESORIOS Y APARATOS .....	26
II.5. INOCULO VIRICO .....	27
II.5.1. Estudio de Viremia. Hemoadsorción .....	28
II.5.2. Estudio de Anticuerpos .....	28
II.5.2.1. Inmunofluorescencia indirecta ..	28
II.5.2.2. Enzimoimmunoensayo (ELISA) ....	29
II.6. ESTUDIOS HEMATOLOGICOS .....	31
II.7. SEPARACION DE LINFOCITOS Y MONOCITOS .....	32
II.8. CARACTERIZACION Y VALORACION DE LINFOCITOS Y MONOCITOS .....	34
II.8.1. Caracterización y valoración de linfoci - tos formadores de roseta espontánea .....	34
II.8.2. Caracterización de linfocitos con inmuno- globulinas de superficie .....	35
II.8.3. Tinción específica para linfocitos (FR, IS) y monocitos .....	36
II.9. ESTIMULACION INESPECIFICA Y ESPECIFICA "IN VITRO" DE LOS LINFOCITOS .....	37
II.9.1. Preparación de los cultivos .....	37
II.9.2. Incorporación de Timidina tritiada .....	39
II.9.3. Interpretación de los resultados .....	40
II.9.4. Preparación del Antígeno .....	40
II.9.5. Estimulación específica "in vitro" .....	41
II.9.6. Valoración de la estimulación específica	41
II.10. ESTUDIOS DE FAGOCITOSIS .....	42

## II

	<u>Pág</u>
II.10.1. Obtención de Monocitos y Polimorfo-nucleares .....	42
II.10.2. Fagocitosis de partículas de Latex .....	43
II.10.3. Fagocitosis de partículas de Zymo - san .....	43
II.10.4. Estudios enzimáticos .....	44
II.11. DETERMINACION DEL COMPLEMENTO .....	45
II.12. MEDIADORES DE LA ANAFILAXIA .....	46
II.12.1. Valoración del Factor de Activación de las Plaquetas mediante la reac - ción antígeno PPA-IgE de los Basófi los .....	46
II.12.2. Incubación con el antígeno especí - fico .....	46
II.12.3. Interpretación de los resultados...	47
II.12.4. Valoración del Factor de Activación de las Plaquetas inducido por Fago - citosis mediante agregación plaque - taria .....	48
II.12.5. Obtención y preparación de las pla - quetas .....	48
II.12.6. Interpretación de los resultados ..	48
II.13. INMUNOPATOLOGIA. DEPOSITO DE INMUNOCOMPLEJOS .....	50
II.13.1. Depósitos de IgG en riñón de cerdo.	50
II.13.2. Depósitos de C <sub>3</sub> en riñón de cerdo..	50
II.13.3. Depósitos de antígeno PPA en riñón de cerdo .....	51
II.14. ESTUDIO DE LA INFECCION "IN VITRO" DE LAS CELULAS DEL SISTEMA INMUNE .....	52
 III. RESULTADOS.	
III.A. ANIMALES INOCULADOS CON EL VIRUS ESPAÑA 75 .	53
III.A.1. Estudio de la infección .....	53
III.A.1.1. Determinación de viremia y anticuerpos .....	53
III.A.1.2. Determinación de anti - cuerpos .....	53
III.A.2. Estudios hematológicos .....	58
III.A.2.1. Valoración cuantitativa de Leucocitos y Linfoci - tos totales .....	58
III.A.2.2. Valoración cuantitativa de Linfocitos FR e IS ..	61

### III

	<u>Pág</u>
III.A.2.3. Análisis mediante la tinción de Esterasa .....	65
III.A.3. Cambios funcionales de la respuesta linfocitaria "in vitro" inducida por mitógenos y antígeno PPA .....	67
III.A.3.1. Respuesta a mitógenos - (PHA, PWM y LPS) .....	67
III.A.3.2. Respuesta al PPA Antígeno.	69
III.A.3.3. Valores comparativos entre el número de Linfocitos FR y su capacidad funcional frente al PHA .....	71
III.A.3.4. Valores comparativos entre el número de Linfocitos IS y su capacidad funcional frente a LPS .....	71
III.A.4. Diferencias inmunológicas entre los animales muertos y sobrevivientes a la infección .....	74
III.A.5. Valoración de la capacidad fagocítica	74
III.A.5.1. Estudios del Monocito-Macrófago y del Polimorfonuclear neutrófilo .....	76
III.A.6. Valoración del Complemento .....	78
III.A.7. Cuantificación del Factor de activación de las plaquetas .....	78
III.A.8. Estudios inmunohistológicos .....	80
III.A.9. Anatomía patológica .....	83
III.B. ANIMALES ADULTOS INOCULADOS CON LOS VIRUS DE REPUBLICA DOMINICANA, BRASIL, LISBOA 60, Y ESPAÑA 79 .....	86
III.B.1. Estudio de la infección .....	86
III.B.2. Determinación de viremia y anticuerpos .....	86
III.B.3. Cuantificación de Leucocitos totales y Linfocitos formadores de roseta ...	89
III.B.4. Respuesta funcional "in vitro" de los Linfocitos frente a mitógenos y al antígeno .....	91
III.B.5. Diferencia en la respuesta funcional de los Linfocitos frente a Peste Porcina Africana y Peste Porcina Clásica	93
III.B.6. Valoración de la capacidad fagocítica de los monocitos y polimorfonucleares	94

#### IV

	<u>Pág</u>
III.B.7. Anatomía Patológica .....	98
III.C. LECHONES INOCULADOS CON VIRUS DE LA REPUBLICA DOMINICANA, BRASIL, LISBOA 60, Y ESPAÑA 79 ...	101
III.C.1. Estudio de la infección .....	101
III.C.2. Determinación de viremia y anticuer - pos .....	101
III.C.3. Cuantificación de Leucocitos totales y Linfocitos formadores de roseta ...	101
III.C.4. Respuesta funcional "in vitro" de los Linfocitos frente a mitógenos y anti - geno .....	105
III.C.5. Anatomía Patológica .....	105
III.D. EFECTOS DEL VIRUS DE LA PPA SOBRE LAS PRINCIPA LES CELULAS DEL SISTEMA INMUNE .....	107
IV. DISCUSION. ....	109
V. CONCLUSIONES .....	118
VI. RESUMEN .....	120
VII. BIBLIOGRAFIA .....	123

### ABREVIATURAS UTILIZADAS

ACD	Citrato de dextrosa ácida
Ag	Antígeno
Br	Brasil
BSA	Suero Albúmina Bovina
C <sub>3</sub>	Componente 3 del complemento
CFR	Células formadoras de roseta (T)
CH <sub>50</sub>	Actividad hemolítica cincuenta del complemento.
CIF	Células con inmunofluorescencia de membrana (B)
CV <sub>1</sub>	Riñón de mono verde (línea celular)
CPM	Cuentas por minuto.
DPI	Días Post Inoculación
EDTA	Etilendiaminotetracetato
EGTA	Etilenglicoltetracetato.
ELISA	Enzyme linked immunosorbent Assay
Esp.79	España 79
FCS	Suero fetal bovino
FM	Fluorescencia de membrana
FR	Formadores de roseta
IB	Índice blástico
IC	Inmunocomplejos
ICc	Inmunocomplejos circulantes
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulinas
IgE	Inmunoglobulina de la clase E
IgG	Inmunoglobulina clase G
IgM	Inmunoglobulina clase M
IS	Inmunoglobulinas de superficie
Lis.60	Lisboa 60
LPS	Lipopolisacárido del E. Coli
M-M	Monocitos-Macrófagos
MS	Línea celular (Riñón de mono)
OPD	Ortofenildiamina
PAF	Factor de activación plaquetaria
PBS	Fosfato bufer salino
PHA	Fitohemaglutinina
PI	Post Inoculación



## VI

PMN	Polimorfonuclear neutrófico
PPA	Peste Porcina Africana
PPC	Peste Porcina Clásica
PWM	Pokeweed Mitógeno
RD	República Dominicana
SIF	Solución de Incubación de Fagocitosis
SLF	Solución de lavado de Fagocitosis
SS	Solución salina
UHA <sub>50</sub>	Unidad Hemoabsorbente cincuenta
UI	Unidades Internacionales
VPPA	Virus Peste Porcina Africana
VPPC	Virus Peste Porcina Clásica

## I. INTRODUCCION

La Peste Porcina Africana (PPA) es una enfermedad vírica del ganado porcino que presenta un cuadro clínico muy similar al de la Peste Porcina Clásica (PPC), caracterizado por la mortalidad generalmente elevada, alteraciones vasculares congestivo-hemorrágicas, trastornos digestivos, respiratorios y nerviosos.

La enfermedad hizo su aparición en España en Mayo de 1960, a través de la frontera con Portugal. Los primeros focos se produjeron en cerdos de explotaciones familiares ubicadas en los suburbios de Badajoz y cuya alimentación estaba constituida por basuras y desperdicios de cocina. El traslado de estos animales a diferentes partes del país en pleno período de incubación, sin diagnosticar, ocasionó la rápida difusión de la enfermedad a numerosas granjas dedicadas a la crianza extensiva del cerdo.

### I.1. IMPORTANCIA DE LA PPA.

Desde Mayo de 1960 hasta Diciembre del mismo año se registraron 631 focos con un total de 119.543 cerdos entre muertos y sacrificados. Aunque todos estos focos quedaron extinguidos, en los años siguientes, la enfermedad presentó reactivaciones y remisiones en forma enzoótica, en las áreas del Sur y Sur-oeste, presentándose de forma esporádica en otras partes del país.

La mayor incidencia de la enfermedad en España en los últimos años se registró en 1977, con 1900 granjas afectadas y un total de 318.000 animales destruidos. Posteriormente los focos se han ido reduciendo progresivamente, siendo en 1981 un total de 300, lo cual representa el menor índice de los últimos años en nuestro país.

En 1978 se produjo la mayor difusión de la enfermedad, hasta la fecha, apareciendo focos en Malta, Cerdeña, Brasil, República Dominicana y Haití y en 1979 un nuevo foco en Cuba. Todos estos nuevos focos ocasionaron una situación de alarma

sanitaria por el riesgo de que la enfermedad siguiera extendiéndose a otros países de América.

La PPA es una enfermedad que presenta graves problemas sanitarios y económicos a los países afectados. Las enormes pérdidas económicas son consecuencia de la alta contagiosidad y mortalidad, así como de los elevados costes de las medidas sanitarias.

Además de las pérdidas en animales que tienen que ser sacrificados e incinerados, hay que añadir las indemnizaciones a los ganaderos por el sacrificio obligatorio e interrupción de la actividad en sus granjas, los gastos importantes del control de la enfermedad así como las perturbaciones en el comercio del cerdo y de sus productos derivados.

Aunque es muy difícil cuantificar las pérdidas totales directas e indirectas causadas por el VPPA en los países afectados, las cifras que estos países han facilitado nos dan una idea de la importancia económica de esta enfermedad (Sánchez Botija et al, 1980).

En España, desde 1960 a 1979 fueron destruidos a causa de la PPA, 2.753.000 cerdos. El costo de las indemnizaciones en este período fué de 4.606 millones de pesetas y el número de granjas afectadas fue de 23.500.

En Portugal, en el período de 1957 a 1978, se destruyeron 886.000 cabezas de ganado (44,8% de su censo) con unos gastos de indemnización de 11.925.000 dólares USA, siendo el total de granjas afectadas de 28.000.

En Italia, en el foco de 1967 fueron destruidos 100.000 cerdos. El foco aparecido en Cerdeña en 1978 ocasionó 50 millones de dólares en pérdidas directas e indirectas.

En Cuba, durante 1971, se sacrificaron 470.000 cerdos y en el reciente foco de 1979 tuvieron que ser sacrificados otros 120.000.

En el foco de 1978 en Malta se sacrificaron 80.000 cerdos. En Brasil, entre Mayo de 1978 y Marzo de 1979 fueron sacrificados 66.550 cerdos. Por último, en la República Dominicana desde 1978 a 1979 se perdieron 270.000 cerdos entre muertos y sacrificados a causa de la PPA.

La falta de una vacuna eficaz es un problema fundamental para luchar contra esta enfermedad. A pesar de los diferentes intentos realizados, dentro y fuera de nuestro país, para obtener una inmunización contra el VPPA mediante virus inactivados o atenuados (Manso Ribeiro et al., 1963, Sánchez Botija, C., 1963, Coggins et al., 1968 y Bommeli, W., et al., 1981) hasta la fecha no se ha tenido el éxito esperado.

Las vacunas inactivadas preparadas con virus inactivados con diferentes productos químicos y administrados con y sin adyuvantes, no producen anticuerpos neutralizantes aunque sí precipitantes, fluorescentes y fijadores del complemento, sin capacidad protectora.

Las vacunas vivas, preparadas con virus atenuados mediante pases por cultivos celulares producen una ligera infección y confieren protección frente al virus homólogo virulento, pero no frente a virus heterólogos. El grado de resistencia frente al virus homólogo virulento parece depender del grado de la virulencia residual del virus vacunal. Así, a mayor virulencia, mayor protección. De ahí que las cepas muy atenuadas confieren inmunidad solamente a una parte de los animales vacunados o no protegen a ninguno. Así mismo, los animales vacunados que resisten la prueba con el virus homólogo virulento pueden presentar lesiones macroscópicas de tipo crónico al sacrificio, mientras que otros no presentan ninguna. La

falta de repetibilidad de estos fenómenos es una característica de todos los ensayos realizados hasta la fecha.

Con el fin de fomentar las investigaciones para obtener una vacuna eficaz contra esta devastadora enfermedad, la PAO y la CEE, en sus diferentes reuniones de 1978 y 1979, acordaron recomendar y estimular las investigaciones sobre la caracterización del virus de la PPA y la respuesta inmune como camino indispensable para conseguir la tan necesaria vacuna.

## 1.2. ETIOLOGIA DE LA PPA.

En los últimos años se ha conseguido un gran avance en el conocimiento del virus de la PPA, tanto en su estructura primaria y antigénica como en su biología molecular.

Desde los trabajos de Haag et al, (1965), Plowringht et al, (1966), Adlinger et al, (1966) y Breese et al, (1966), se conocía que el ácido nucleico del VPPA es del tipo DNA con simetría icosaédrica y ensamblaje en el citoplasma. Los trabajos de Enjuanes et al, (1976) demostraron que el DNA es lineal de doble cadena y peso molecular de  $10^8$  daltons. Posteriores trabajos de Tabarés et al, (1979) demostraron que el DNA se sintetiza en el núcleo de las células infectadas desplazándose posteriormente al citoplasma celular donde, como ya se había descrito, se ensambla.

Los primeros trabajos sobre la caracterización de las proteínas del VPPA fueron realizados por Black et al, (1976) y Vigarío et al, (1977) los cuales caracterizaron un total de cinco proteínas. Posteriores trabajos de Tabarés et al, (1980) utilizando nueva tecnología identificaron y caracterizaron 28 polipéptidos en el virus intracelular, con pesos moleculares que oscilan entre 11.500 y 243.000 daltons. Catorce de estos polipéptidos han sido localizados en la envuelta siendo tres de ellos glicoproteínas. Desde el punto de vista antigénico frente a un suero hiperinmune han sido caracterizados, por este mismo autor, un total de seis polipéptidos con pesos moleculares de 172.000, 162.000, 146.000, 73.000, 34.000 y 12.000, siendo la proteína mayoritaria la de peso molecular 73.000 daltons (VP 73).

Ultimamente, la proteína mayoritaria, VP 73, ha sido purificada a partir de células infectadas, siendo utilizada como antígeno en el método ELISA indirecto con resultados muy satisfactorios (Sánchez-Vizcaíno et al, 1981, Tabarés et al., 1982). Esta misma proteína fue inoculada a cerdos para estudiar su capacidad de protección frente al VPPA virulen-

to, pero los resultados han demostrado que, aunque es muy antigénica, los anticuerpos inducidos por ella no protegen frente al virus (Tabarés et al., 1981).

En los recientes trabajos sobre la caracterización del ge noma viral de diferentes cepas del VPPA (Lisboa 60, V-63, Hai tí, Brasil y República Dominicana) mediante enzimas de res - tricción, Wesley et al, (1981) han demostrado la posibilidad de utilizar esta tecnología para la caracterización y dife - renciación de cepas víricas.

### I.3. INMUNIDAD DE LA PPA.

Los conocimientos sobre los mecanismos inmunitarios que tienen lugar en la infección tanto natural como experimental por el virus de la PPA actualmente todavía presentan grandes lagunas respecto del efecto del virus sobre las células del sistema inmune, de la respuesta humoral y de base celular, y de la inmunopatología de esta enfermedad.

Desde los primeros trabajos realizados por De Tray, (1957) se observó, en el transcurso de la infección por VPPA, una marcada leucopenia linfocítica con un considerable aumento de los polimorfonucleares neutrófilos, lo que sugería que los linfocitos y monocitos eran afectados por el VPPA no siendo los polimorfonucleares. Trabajos posteriores han confirmado estos hallazgos. Así, Malmquist et al, (1960) ponían de manifiesto que el VPPA cultivado en leucocitos de cerdo afectaba a los monocitos produciendo el efecto de hemoadsorción con los eritrocitos del mismo cerdo y posterior efecto citopático. Esta observación ha tenido una enorme importancia posterior como método de aislamiento e identificación del VPPA. Los trabajos de Wardley et al, (1977) también pusieron de manifiesto la acción del virus de la PPA sobre los linfocitos, mientras que Enjuanes et al, (1977) confirmaban la acción del VPPA sobre los monocitos porcinos así como de otras especies animales.

El estudio de la respuesta humoral durante la infección de VPPA en los primeros focos europeos fue prácticamente imposible de realizar, dado que los animales morían en períodos de tiempo tan cortos que no tenían tiempo para la producción de ningún tipo de respuesta. Poco a poco esta situación fue cambiando de forma natural, al igual que aparecieron las primeras cepas atenuadas de VPPA en el laboratorio. Así, en los trabajos de Malmquist et al, (1963) se pone de manifiesto la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemoadsorción y precipitantes. Este mismo autor comunica la supervivencia de animales a la infección de VPPA con viremia persistente y presencia de anticuerpos.



Repetidos ensayos en varios laboratorios confirmaron que los cerdos supervivientes de la infección natural o de la infección experimental con cepas parcialmente atenuadas generalmente resisten la reinfección con el virus homólogo virulento, pero no resisten las cepas de virus heterólogos, quedando la mayoría de los animales como portadores. El mecanismo de esta resistencia parece ser independiente de los anticuerpos neutralizantes (Coggins et al., 1968, De Boer et al., 1969) aunque si fueron detectados anticuerpos inhibidores de la hemoadsorción (Malmquist et al., 1963), precipitantes (Coggins et al., 1968) y fijadores de complemento (Cowan et al, 1961). La significación funcional de estos anticuerpos no ha podido todavía ser determinada.

La falta de anticuerpos neutralizantes frente a VPPA parece estar más relacionada con el virus en sí que con la capacidad de respuesta del cerdo, ya que en los trabajos de De Boer et al, (1967) se demostró que durante una infección de VPPA los cerdos podían producir anticuerpos neutralizantes frente al virus de la Fiebre Aftosa. Por otra parte, en ninguna de las especies animales inoculadas hasta la fecha con el VPPA (cobaya, conejo, cabra, oveja y caballo) se han podido detectar anticuerpos neutralizantes.

Pan et al, (1970) y Hess et al, (1977) han observado una marcada hipergamaglobulinemia durante la infección con VPPA parcialmente atenuado, que ha sido explicada como consecuencia de la infección persistente.

Todos los autores hasta la fecha parecen coincidir en que el sistema humoral no se encuentra alterado durante las infecciones crónicas de VPPA y que la falta de anticuerpos neutralizantes debe ser explicada en función de las características propias del virus.

En el área de la inmunidad de base celular, durante la

infección con VPPA, son muy pocos los trabajos realizados hasta la fecha.

Shimizu et al, (1977) estudiaron la respuesta inmunitaria de base celular en cerdos inoculados paralelamente con el virus Lisboa 60 parcialmente atenuado y el *Corynebacterium* tuberculoso. La técnica que utilizaron estos autores fué la inhibición de la emigración leucocitaria frente al antígeno específico y los resultados demostraron que la respuesta de base celular se mantenía normal durante la infección con este virus de PPA. Todos los cerdos respondieron tanto al antígeno preparado con el virus Lisboa 60 como al *Corinebacterium*.

Hess et al, (1977) en un estudio sobre algunos parámetros de la respuesta humoral y de base celular en cerdos adultos inoculados con el virus de PPA Lisboa 60 parcialmente atenuado, observaron una marcada linfocitosis acompañada de fluctuaciones en número de los linfocitos T y B de la sangre, al ser los cerdos inoculados con el mismo virus virulento. La linfocitosis la relacionaban con el aumento de las células "null" y su conclusión fue que la respuesta de base celular no se encuentra significativamente alterada en esta infección.

Wardley et al, (1980) estudiaron la respuesta de base celular en cerdos inoculados con cepas de alta virulencia (Kiwira) y de baja virulencia (Uganda). Cuantificaron las poblaciones linfocitarias T y B mediante los receptores de superficie específicos de cada célula y la capacidad funcional de los linfocitos la estudiaron mediante la técnica de la transformación blástica frente a mitógenos y al antígeno específico de PPA. Los resultados demostraron una leucopenia linfocítica más marcada en los linfocitos B que en los T. La respuesta blástica a los mitógenos se encontraba más deprimida en las células B que en las T, en cuanto a la in -

ducción blástica específica en los cerdos inoculados con las cepas avirulentas, observaron una respuesta significativa frente al antígeno de PPA, no produciéndose ningún tipo de respuesta en los linfocitos de los cerdos inoculados con la cepa virulenta.

No existe ningún trabajo dedicado al estudio de la respuesta fagocítica durante la infección de VPPA, ni tampoco el papel que las linfoquinas puedan jugar como mecanismos defensivos frente al VPPA.

Tampoco en el área de la Inmunopatología existe ningún trabajo dedicado a las infecciones por VPPA.

#### I.4. OBJETIVO Y JUSTIFICACION.

Esta Tesis tiene como objetivo el estudio de algunos fenómenos inmunológicos más significativos de la respuesta inmune frente a las infecciones víricas, que no habían sido explorados hasta la fecha en la Peste Porcina Africana.

Hace unos años la respuesta inmune a las infecciones víricas era relacionada únicamente con la producción de anticuerpos. Posteriores observaciones aportaron nuevas informaciones respecto a dicha respuesta. Así por ejemplo, en la especie humana se comprobó que individuos con una deficiencia congénita en la producción de anticuerpos, eran susceptibles a las infecciones con el virus de la Polio pero resistían bien las infecciones por otros virus. Por el contrario, aquellos que presentaban una respuesta humoral normal pero deficiencia en la respuesta de base celular, no eran susceptibles al virus de la Polio, pero sí a otros virus como Herpes simples, Varicella-Zoster, y Citomegalovirus (Cooper, M.D. et al., 1968).

En los animales de experimentación se ha podido demostrar en la infección por virus Cosackie que los anticuerpos transferidos pueden detener la citada infección (Rager-Zisman, et al., 1973), mientras que en el caso de una infección por Herpes simple se necesita transferir macrófagos o linfocitos T de un animal ya recuperado (Rager-Zisman., 1976).

Hoy día se admite que la respuesta frente a los virus es un conjunto de componentes humorales, celulares y fagocíticos que están correlacionados entre ellos dependiendo de la naturaleza del virus, vía de infección y de la relación huésped virus (Olgra, P.L. et al., 1975).

Uno de nuestros primeros objetivos fué el poder caracterizar la leucopenia linfocítica que se produce durante la infección con VPPA determinando el tipo de subpoblación afectada.

Se conocía desde los trabajos de Katz, D, (1977) que, en virtud de sus receptores específicos de membrana y de ciertas funciones, existían, al menos, dos subpoblaciones linfocitarias. De una parte las células T, que han madurado en el timo y son las responsables de los fenómenos de inmunidad celular e hipersensibilidad retardada. De otra parte los linfocitos B, a los que se considera responsables de la inmunidad humoral y la hipersensibilidad inmediata.

Por lo que respecta al cerdo los linfocitos T han sido bien caracterizados. Se ha observado que, también en esta especie, el linfocito T forma rosetas con los eritrocitos de carnero (Escajadillo et al., 1975). Se ha descrito por otra parte, que los linfocitos T pueden ser diferenciados por la capacidad citotóxica de un suero de oveja anti-timocitos (Symons et al., 1980).

Funcionalmente los linfocitos T porcinos han sido caracterizados "in vitro" mediante la transformación blástica frente a los mitógenos Fitoheماغلوتينina, Pokeweed y Concaavalina A (Buschmann, H. et al., 1980). De todos ellos, es la Fitoheماغلوتينina la que induce una mayor estimulación blástica.

Asimismo los linfocitos B del cerdo han sido caracterizados al igual que en otras especies por poseer inmunoglobulinas de superficie (Binns et al., 1974) (Shimizu et al., 1976). También se ha podido demostrar en estos linfocitos la presencia de receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas (Binns et al., 1974). En cuanto a la respuesta funcional mediante la técnica de blastogénesis, ha sido descrita por Symons et al, (1979) y Symons et al, (1980) la capacidad de estos linfocitos para responder frente al Lipopolisacárido (LPS) de E. Coli.

Sobre la base de la información antes expuesta y utilizando la tecnología adecuada hemos intentado caracterizar la leu

copenia linfocitaria inducida durante la infección de VPPA con los diferentes virus utilizados.

Otro de nuestros objetivos era comprobar si la infección por VPPA seguía patrones semejantes a los de otras infecciones víricas respecto a la aparición secuencial de las diferentes clases de inmunoglobulinas. Normalmente, en las infecciones víricas la respuesta inicial en la producción de anticuerpos es la aparición de la inmunoglobulina IgM, la cual es secuencialmente reemplazada por IgG tal y como ya fue demostrado por Brown et al, (1959) en vacas infectadas con el virus de la Fiebre Aftosa, apareciendo también otras inmunoglobulinas tales como IgA e IgE, aunque la presencia de estas últimas varía notablemente de un virus a otro.

En el cerdo las inmunoglobulinas que han sido relacionadas con la respuesta inmune, son principalmente IgM e IgG a nivel sistémico y la IgA a nivel local (Porter et al., 1972). Las inmunoglobulinas de la clase IgG presentan un coeficiente de sedimentación de 7S y es cuantitativamente la más importante en esta especie animal. Se han encontrado, al menos, cuatro diferentes subclases que presentan diferencias antigénicas y físico-químicas. De estas subclases, la IgG1 e IgG2 aparecen en forma mayoritaria.

La inmunoglobulina porcina IgM presenta un coeficiente de sedimentación de 19S y se encuentra en menor proporción que la IgG, representando, aproximadamente el 5% de la cantidad total de inmunoglobulinas séricas y calostrales (Porter et al., 1972).

También se ha descrito en esta especie animal la inmunoglobulina IgA, que se encuentra en la mayoría de las secreciones naturales exocrinas, tanto en su forma monomérica como en su forma de complejos de IgA.

En este trabajo, y mediante la técnica inmunoenzimática ELISA y la liberación de PAF de los basófilos, hemos abordado la detección y valoración de la producción de IgM e IgE específica, en la infección por algunos de los virus de la PPA utilizados en este trabajo, con el fin de obtener información sobre dichas inmunoglobulinas no estudiadas hasta la fecha en esta enfermedad.

Otro importante objetivo en la planificación de esta tesis era estudiar algunos aspectos de la respuesta de base celular que todavía seguían oscuros o no estudiados. La importancia que la inmunidad de base celular presenta en las enfermedades víricas fue puesta de manifiesto por Allison, A.C. (1971 y 1972). Este autor demostró la presencia de reacciones de hipersensibilidad tras una inyección intradérmica de virus en un animal infectado previamente. Transfirió reacciones de hipersensibilidad de un animal sensibilizado a otro animal normal mediante células inmunes y no mediante suero. Pudo inducir transformación linfoblástica en los linfocitos de un animal sensibilizado con un virus al poner los citados linfocitos en contacto con el antígeno vírico específico. Por último, observó la inhibición de los macrófagos en presencia del antígeno específico.

Otras evidencias del papel que la inmunidad de base celular juega en la protección frente a las enfermedades víricas ha sido obtenido de estudios clínicos de enfermos con hipogammaglobulinemia congénita y respuesta de base celular normal, los cuales solo presentaban especial sensibilidad al virus de la Poliomielitis (Chang et al., 1966), mientras que, por el contrario, enfermos con deficiencias en la respuesta de base celular y con respuesta humoral presentan gran sensibilidad al virus de la vacuna (O'Connell et al., 1964), Herpes (Kretschmer et al., 1969), Varicela (Lux et al., 1970) y Citomegalovirus (Miller et al., 1967).

La importancia de la inmunidad de base celular como mecanismo de defensa frente a las infecciones víricas ha sido también demostrada en los animales de experimentación. Animales timectomizados o tratados con sueros antilinfocitos T aumentan su susceptibilidad frente a las infecciones víricas. Estos mismos animales han servido para poder conocer mejor la célula principal de este tipo de respuesta inmune, el linfocito T.

De acuerdo con Allison, A.C. (1972) hay, por lo menos, tres mecanismos por los cuales la inmunidad de base celular podría proteger contra las infecciones víricas: (1) Transformación blástica de los linfocitos, inducida por el antígeno que lleva a la producción de Interferón y otras linfoquinas, así como disponer de mayor número de células activas. (2) Activación de los Macrófagos incrementando el número de enzimas lisosomales y la capacidad de fagocitosis fíctica de estas células. (3) Citotoxicidad mediada por linfocitos frente a células diana con antígenos de superficie. De dichos mecanismos de inmunidad celular según Allison, el estudio de los dos primeros (transformación blástica de los linfocitos y activación de los macrófagos) en esta enfermedad, han sido así mismo objetivos de este trabajo para ampliar la información sobre el mecanismo inmunitario de base celular sobre el que todavía existen escaso número de publicaciones.

Con relación al estudio de la capacidad funcional de las células fagocíticas (macrófagos y polimorfonucleares) en las infecciones virales es conocido que dichas células presentan receptores en sus membranas para el fragmento Fc de la inmunoglobulina G y para el fragmento C3b de la fracción tercera del complemento. Mediante los cuales son activadas y se desencadena el proceso fagocítico con sus diferentes fases de adherencia, englobamiento, desgranulación y digestión.

En las infecciones víricas parece ser el monocito la célula



la fagocítica que juega el papel protector más importante (Allison, A.C. et al., 1974). Esta célula actúa principalmente eliminando los inmunocomplejos mediante su activación a través de su receptor para Fc de la inmunoglobulina G o por los receptores para la fracción del complemento. Gracias a estos mecanismos el inmunocomplejo es fagocitado y eliminada la posible actividad residual del virus. Este mecanismo, no obstante, parece no ser muy efectivo en las infecciones por virus que presentan tropismo selectivo por el monocito, tales como en la Coriomeningitis Linfocitaria y en la Anemia Infecciosa Equina.

Dada la gran importancia que este mecanismo fagocítico presenta en las infecciones víricas su estudio en la Peste Porcina Africana enfermedad en la que no existía información al respecto ha sido otro de los objetivos que justifican esta tesis.

De igual forma y dado el carácter persistente de la infección por el virus de la PPA, incluimos en nuestro trabajo el estudio "in vitro" de la infección selectiva por dicho virus sobre las poblaciones celulares purificadas de macrófagos y polimorfonucleares.

Finalmente, otro objetivo que justifica la tesis fue estudiar en la PPA algunos aspectos inmunopatológicos importantes en la patogénesis de otras infecciones víricas con infección persistentes y que en esta enfermedad del cerdo no habían sido estudiados hasta la fecha. A este respecto debemos recordar la observación clásica de la presencia simultánea de virus y anticuerpos en la sangre durante la infección por el virus de la PPA (Malmquist et al., 1963, De Boer et al., 1967; Coggins et al., 1968). Dicha observación ha sugerido la posibilidad de la formación de inmunocomplejos circulantes y de depósito con el consiguiente consumo de complemento. Estos hechos justifican los estudios realizados en es-

te trabajo para comprobar la posible disminución del complemento circulante así como los depósitos de inmunocomplejos a nivel del riñón.

Respecto al importante fenómeno de la deposición de los inmunocomplejos recordaremos que Benveniste et al, (1974 y 1977) pusieron de manifiesto, en el conejo, la presencia con comitante de reacciones de hipersensibilidad inmediata y de reacciones por inmunocomplejos, comprobándose que para que los inmunocomplejos se depositaran en las estructuras vasculares del riñón se necesitaba la colaboración de ciertas aminas vasoactivas que eran liberadas a nivel local (Benveniste et al., 1972 y 1974., Cochrane et al., 1963 y 1973; Henson et al., 1977; Knicker et al., 1968). Dado que las células circulantes con mayor cantidad de aminas vasoactivas son los basófilos y las plaquetas (Nachman et al., 1972 y Waalkes et al., 1959), estas células son consideradas de gran importancia en la liberación de las aminas.

Por todo lo anteriormente mencionado hemos incluido entre los objetivos de la tesis los estudios para poner de manifiesto si en esta infección se encontraba paralelismo entre los inmunocomplejos de depósito y la liberación de aminas vasoactivas, a partir de las células citadas, como consecuencia de una reacción de hipersensibilidad inmediata, empleando para ello la metodología descrita por Benveniste et al, (1972).

## II. MATERIAL Y METODOS.

### II.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

En la realización del presente trabajo se han utilizado un total de cincuenta cerdos adultos y veinticinco lechones cuyas características se exponen a continuación.

Adultos: Los cerdos adultos eran de la raza Large White-Landrace, con pesos comprendidos entre los 40 y 45 kg. Estos animales se encontraban en perfectas condiciones sanitarias y no habían sido vacunados frente a ninguna enfermedad.

Lechones: Los veinticinco lechones fueron obtenidos de cuatro cerdas gestantes mediante cesárea y no fueron alimentados con calostro.

Todos los animales fueron divididos de la siguiente forma:

Primer grupo: Quince cerdos adultos fueron inoculados con el virus de la PPA España 75 parcialmente atenuado (II.5.1. utilizándose otros diez adultos como controles.

Las muestras para realizar los diferentes análisis fueron tomadas semanalmente siendo la duración total del experimento de cinco semanas.

Segundo grupo: En este trabajo se estudiaron otros veinticinco cerdos adultos. En esta ocasión se dividieron en grupos de cinco, inoculándose con virus aislados en la República Dominicana (RD), Brasil (Br), Lisboa 60 (Lib 60) y España 79 (Esp 79). (II.5.1.). Uno de los grupos se dejó como control.

Las muestras para efectuar los análisis fueron tomadas en este grupo cada 4 días y la duración total de estos

trabajos fue de 22 días.

Tercer grupo: Para realizar los experimentos de este tercer grupo se utilizaron veinticinco lechones, los cu les fueron distribuidos e inoculados igual que en el segundo grupo. La duración de estos trabajos fue de 10 días con intervalos en las tomas de muestras de 4 días.

## II. 2. REACTIVOS.

- Acetona. Merck
- Acido Acético. Merck.
- Acido Cítrico. Merck.
- Acido Clorhídrico. Merck.
- Acido Sulfúrico. Merck.
- Alcohol Etilico. Merck.
- Alcohol Metilico. Merck.
- Alsever Sol. Microbiological Associates.
- Azul de Tripan (0,01%). Sigma Chemical Comp.
- Cetrimida. Sigma Chemical Comp.
- Citrato de Dextrosa Acida. Sigma Chemical Comp.
- Cloruro Cálcico. Merck.
- Cloruro Magnésico. Merck.
- Cloruro Sódico. Merck.
- Fitoheماغلوتينina (PHA). Grand Island Biological Corp.
- Fosfato Disódico. Merck.
- Formol. Merck.
- Gelatina (2,5%). Sigma Chemical Comp.
- Glutamina 2 mM. Flow Lab.
- Hank's, Solución de. Microbiological Associates.
- Heparina. Laboratorios LEO.
- Hepes. Flow Lab.
- IgG de conejo anti-inmunoglobulinas totales de cerdo -  
marcada con isocianato de fluoresceína (1/5). Cappel La  
boratorios.
- IgG de Conejo anti-C3 de cerdo marcada con isocianato -  
de fluoresceína (1/8). Cappel Lab.
- IgG de Conejo anti-IgG (H + L) porcina marcada con Hor-  
se Radish Peroxidase (1/2000). Nordic Lab.
- IgG de conejo anti-IgM (Fc) porcina marcada con Horse -  
Radish Peroxidase (1/1000). Nordic Lab.
- IgG de conejo anti-VPPA marcada con isocianato de fluo-  
resceína INIA (Dr. A. Ordas)
- Latex (Bacto-Latex 0,81). Difco Lab.

- Lipopolisacárido de E. coli (LPS). Sigma Chemical -  
Comp.
- Lymphomedix. Laboratorios Biomedics.
- Naranja de Acridina (0,01%). Sigma Chemical Corp.
- Neuroaminidasa (2UI/ml). Behring Institute.
- Ortophenilediamine (OPD). Sigma Chemical Corp.
- Paranitrofenil Fosfato. Merck.
- Pokeweed Mitogen (PWM). GIBCO Lab.
- RPMI-1640. Flow Lab.
- Seroalbúmina Bovina (BSA). Sigma Chemical Corp.
- Serotonina Tritiada. Nuclear Ibérica.
- Suero Fetal Bovino. Microbiological Associates.
- Timidina Tritiada. Nuclear Ibérica.
- Trombina (10UI/ml ). Sigma Chemical Corp.
- Tris. Sigma Chemical Corp.
- Toluol. Merck.
- Tween 20. Merck.
- Verde Metilo. Sigma Chemical Corp.
- Zymosan A de levadura de cerveza. Sigma Chemical Comp.

### II.3. SOLUCIONES QUIMICAS.

#### - PBS BUFER 10X

$\text{PO}_4\text{HNa}_2$ .....	10,93 g
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....	3,65 g
$\text{ClNa}$ .....	74,00 g
Agua destilada .....	1.000 ml

Ajustar pH a 7,2

Conservar a 4°C

#### - SOLUCION DE FAGOCITOSIS (Base)

$\text{ClNa}$ .....	160 g/l (a)
$\text{ClK}$ .....	3,90 g/l (b)
$\text{ClMg}$ .....	4,25 g/l (c)
$\text{Cl}_2\text{Ca}$ .....	5,70 g/l (d)
Tris .....	24,22 g/l

solución de lavado de fagocitosis:

50 ml (a) más 50 ml (b) más 4,77 g Hepes más 2,5 g BSA más 1 g de glucosa. Agua destilada (100 ml). Ajustar pH a 7,4.

solución de incubación de fagocitosis.

50 ml de (a) más 50 ml (b) más 50 ml (c) más 50 ml (d) más 4,77 g de Hepes más 2,5 g BSA más 1 g glucosa. CSP 1 litro. Ajustar pH a 7,4.

#### - SOLUCION LAVADO ELISA

Tween 20 .....	0,5 ml
solución salina 0,85% .....	1.000 ml
Conservar a 4°C	

#### - PBS TWEEN 20

$\text{ClNa}$ .....	8,0 g
---------------------	-------

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ .....	0,2	g
$\text{PO}_4\text{Na}_2 12 \text{H}_2\text{O}$ .....	2,9	g
$\text{ClK}$ .....	0,2	g
Tween 20 .....	0,5	ml
Agua destilada .....	1.000	ml

Ajustar pH a 7,4. Revisar antes de usarlo

Conservar a 4º C

- BUFER CITRATO

$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \text{H}_2\text{O}$ .....	2,14	g
$\text{PO}_4\text{HNa}_2 2\text{H}_2\text{O}$ .....	3,54	g
Agua destilada .....	400	ml

Ajustar a pH 5.

Conservar a 4º C

- SUBSTRATO

Ortofenildiamina: 40 mg en 100 ml de bufer citrato más  
40 microlitros de agua oxigenada al  
30%.

- CARBONATO BUFER

$\text{CO}_3\text{Na}_2$ .....	1,59	g
$\text{CO}_3\text{HNa}$ .....	2,93	g
Agua destilada .....	1.000	ml

Ajustar pH a 9,6. Revisar antes de usarlo

Conservar a 4º C

- SOLUCION ACD

Acido Citrico .....	8,0	g
---------------------	-----	---



Citrato sódico .....	22,0	g
Glucosa .....	24,5	g
Agua destilada .....	1.000	ml

Usar 1 ml de ACD por cada 5 ml de sangre

#### - SOLUCION DE TYRODE

Todas estas soluciones deben de hacerse el mismo día-de su uso:

##### a) Solución base:

ClNa .....	8,0	g
ClK .....	0,195	g
CO <sub>3</sub> HNa .....	1,02	g
Cl <sub>2</sub> Mg x 6H <sub>2</sub> O .....	0,213	g
Cl <sub>2</sub> Ca .....	0,145	g
Glucosa .....	1	g
Agua destilada .....	1.000	ml

Ajustar pH a 7,2

##### b) Tris-Tyrode:

Igual que (a), pero sustituyendo el CO<sub>3</sub>HNa por - 0,01 M Tris.

##### c) Gelatina-Tyrode:

Igual que (a), pero subiendo la concentración de gelatina a 2,5 g/l

##### d) Tris-Tyrode BSA:

Igual que (b), pero cambiando la concentración de BSA, en este caso, 2,5 g/l

##### e) Gelatina-Tyrode sin calcio:

Igual que (c), pero sin calcio y ajustando el PH a 6,5.

- f) Gelatina-Tyrode sin calcio y con EGTA:  
Igual que (e) pero con 0,1 mM de EGTA.
- g) Tris-Tyrode sin calcio ni magnesio:  
Igual que (b) pero sin Ca y Mg
- h) Tris-Tyrode sin calcio ni magnesio y con EGTA:  
Igual que (g) pero con 0,1 mM de EGTA.

- FIJACION PARA ESTERASAS

PO <sub>4</sub> HNa 12 H <sub>2</sub> O .....	50	mg
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K .....	100	mg
Acetona pura .....	45	ml
Formol puro .....	25	ml
Agua destilada .....	30	ml

Ajustar pH a 6,6

- TINCION ESTERASAS

- a) Bufer fosfato 1,15 M pH 7,6
 

PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na .....	8,7	ml
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K .....	1,3	ml
- b) 10 mgr de α Naftil acetato en 0,5 ml  
de Etilen glicol monometil eter.
- c) Pararrosemilina Heceztiazada .. 0,6 ml

- LIQUIDO DE CENTELLEO

2,5-PPO .....	6	g
Dimetil-POPOP .....	0,2	g
Toluol .....	1.000	ml

#### II.4. ACCESORIOS Y APARATOS.

- Centrifuga 42 C JOUAN (E-95)
- Colector celular Mash II. Microbiological Associates.
- Colorímetro Multieskan. Flow Lab.
- Contador celular Celloscope 101. Linson Instrument.
- Contador de partículas beta. Beckman Instruments.
- Falcon estériles 25, 100. Corning.
- Filtros de fibra de vidrio. Reere Angel.
- Lámpara ultravioleta. E-Sylvania G15TS.
- Lavador ELISA. Dynawasher. Dynatech.
- Microscopio de fluorescencia y Optico. Leitz. Labor - lux 11.
- Microscopio invertido. Unión. MIC 3-445.
- Microtomo de congelación. Beckman.
- Micropipetas Multicanal. Flow Lab.
- Placas Microtiter M-129 B. Dynatech.
- Placas Microtiter estériles M-127 TC. Dynatech.
- Tubos Leighton.
- Tubos estériles de (3 y 12 ml) Soria Greiner.

## II.5. INOCULO VIRICO.

para estudiar las posibles variaciones inmunológicas en función de la virulencia y tipo de virus se utilizaron diferentes aislados del VPPA cuyas características más significativas se exponen a continuación:

En el primer grupo de experiencias los animales fueron inoculados con el España 75 atenuado, para su atenuación el virus fue inoculado primeramente en leucocitos de cerdo normal, produciéndose una total destrucción de estos en 48 horas. El sobrenadante infeccioso, libre de restos celulares, fue seguidamente inoculado en la línea celular CV<sub>1</sub> (Kidney African Green Monkey) donde se realizaron cuatro pases consecutivos, utilizando el sobrenadante del último pase para su inoculación en la línea celular VERO, realizándose tres pases más en esta última. El sobrenadante del último pase era inoculado en leucocitos normales de cerdo, donde se realizaron dos pases para evitar así los posibles antígenos celulares de las mencionadas líneas. El sobrenadante del último pase sobre los leucocitos fue utilizado como inóculo infectante. La inoculación se realizó intramuscularmente, la dosis era de  $10^{6,6}$  UHA<sub>50</sub> en un volumen total de dos mililitros.

En el segundo y tercer grupo de experimentos se inocularon aislados procedentes de la República Dominicana, Brasil, Lisboa 60 y España 79. Las dos primeras consideradas de baja virulencia en cerdos adultos, y las dos segundas de alta virulencia. Estos aislados solo sufrieron un pase por leucocitos en el laboratorio.

Las dosis inoculadas tanto a los cerdos adultos como a los lechones fueron:

República Dominicana .....	$10^{5,3}$ (UHA <sub>50</sub> )
Brasil .....	$10^{6,1}$ (UHA <sub>50</sub> )

Lisboa 60 .....	$10^{4,1}$	(UHA <sub>50</sub> )
España 1979 .....	$10^{5,8}$	(UHA <sub>50</sub> )

Las inoculaciones se realizaron oral-intranasal con un volumen total del inóculo de tres mililitros por animal

#### II.5.1. Estudio de Viremia. Hemoadsorción

A lo largo de la experiencia fueron estudiados los niveles de viremia de cada animal mediante la técnica de la Hemoadsorción, primeramente descrita por Malmquist y Hay (1960). En breve descripción, dos ml de sangre eran extraídos a cada animal inoculado, dejándose coagular a temperatura ambiente. El suero era utilizado para la valoración de anticuerpos (II.5.2.) y con el coágulo era preparado un macerado en solución de Hanks al 20%. Dicho macerado fue inoculado en leucocitos de cerdo, observándose durante 10 días el posible efecto de la hemoadsorción.

#### II.5.2. Estudio de anticuerpos

La valoración de anticuerpos específicos de PPA se realizó a partir de los sueros obtenidos previamente (II.5.1.), mediante las técnicas de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la técnica inmunoenzimática (ELISA).

II.5.2.1. Inmunofluorescencia indirecta. - Descrita primeramente por Bool y et al, (1969) y posteriormente aplicada de forma rutinaria por Sánchez Botija et al, (1970). A forma de resumen, una monocapa celular de la línea MS (Monkey Stable Kidney) se cultivó en portaobjetos de tubos Leighton;

cuando los tapices eran confluentes, fueron inoculados con el virus de la PPA. Después de 24 horas de incubación a 37° C, eran recogidos los portaobjetos y lavados en una solución de PBS pH 7,2, secados y fijados en acetona durante 10 minutos a temperatura ambiente. Todos los portaobjetos fueron conservados a -20° C hasta su uso. Para realizar la técnica, estos portaobjetos fueron cubiertos con diferentes diluciones de los sueros problema e incubados a 37° C durante 30 minutos; posteriormente se lavaron dos veces en PBS pH 7,2, tiñéndose a continuación con un suero de conejo anti IgG de cerdo, marcado con fluorescencia, durante 30 minutos a 37° C. Transcurrido este tiempo, los portaobjetos se lavaron tres veces en PBS pH 7,2. Una vez secados eran montados en glicerina (tamponado a pH 9,1) y examinados con un microscopio de fluorescencia.

II.5.2.2. Enzimoimmunoensayo (ELISA)..- La técnica inmunoenzimática ELISA para la detección de anticuerpos de la clase IgG de PPA fue primeramente descrita por Sánchez-Vizcaíno et al, (1979). En posteriores trabajos Sánchez-Vizcaíno et al, (1981) se adaptó esta técnica también para la detección de IgM. En resumen, para realizar esta técnica el antígeno soluble de VPPA fue adsorbido a una placa microtiter de poliestireno mediante la incubación a 4° C durante toda la noche en carbonato-bicarbonato buffer. Las diferentes diluciones de los sue

ros problemas y controles eran depositados en los diferentes pocillos de la placa en volúmen de cien microlitros/pocillo e incubados a 37° C durante una hora, tras lavar la placa, fueron añadidos cien microlitros/pocillo del conjugado (IgG de conejo anti IgG (H + L) ó IgM (Fc) de cerdo marcado con peroxidasa) incubándose, esta vez, una hora a temperatura ambiente. La placa fue de nuevo lavada y cien microlitros del substrato (OPD) fueron añadidos a todos los pocillos. Tras un período de incubación a temperatura ambiente de quince minutos la reacción fue frenada con ácido sulfúrico y la placa se leyó en un colorímetro a 450 nm.

## 11.6. ESTUDIOS HEMATOLOGICOS.

En todos los animales se estudiaron sus constantes hemáticas, tanto en condiciones fisiológicas como tras la inoculación con el virus a lo largo de todo el experimento.

El recuento hemático se realizó mediante un Celloscope 101, utilizándose como diluyente para los leucocitos una dilución de Cetrimida; para los eritrocitos el diluyente era una solución salina formolada. Las fórmulas hemáticas fueron estudiadas siguiendo el método de tinción de Giemsa.



## II.7. SEPARACION DE LINFOCITOS Y MONOCITOS.

Los linfocitos y monocitos se obtuvieron de cada animal, a partir de sangre heparinizada (25 UI/ml), extraída por punción de la vena cava anterior. Esta sangre era diluida a partes iguales en RPMI-1640, depositándose 5 ml de esta mezcla sobre 4 ml de Lymphomedix. Se centrifugó a 425 x g durante 35 minutos. Los linfocitos y monocitos eran recogidos mediante pipetas pasteur de la banda central situada entre el plasma y el Lymphomedix. Se lavaron 3 veces en RPMI-1640, resuspendiéndose tras el último lavado en el mismo medio (175 x g durante 10 minutos).

El número de células vivas se determinó por tinción con azul de tripano al 0,02%, tomándose siempre aquellas que se encontraban entre el 90 y 95% de viabilidad. Una vez contado el número de células, eran ajustadas, las cantidades obtenidas, a los óptimos requeridos para cada caso (II.8, II.9, II.10).

Todas estas operaciones se realizaron en condiciones de esterilidad.

De la misma forma, sangre de tres cerdos controles fue utilizada para la obtención de linfocitos T y B, monocitos y polimorfo nucleares. Tras la obtención de la banda, antes mencionada, las células T, B, M-M y PMN eran separadas siguiendo la técnica descrita por Valero F. y Sánchez-Vizcaino (1982). En breve descripción, las células recogidas de la banda de Lymphomedix eran lavadas 3 veces en medio, resuspendidas en RPMI-1640 e incubadas durante 2 horas a 37°C en Falcon de plástico. Recogido el sobrenadante era colocado en otro Falcon e incubado nuevamente. El segundo sobrenadante, libre de células adherentes, era tratado con eritrocitos de carnero (II.8.1) y centrifugado en un gradiente de Lymphomedix a 425 x g durante 30 minutos. En estas condiciones las células no formadores de roseta se encontraban en la banda entre el

plasma y el Lymphomedix mientras que las células FR se hallaban en la parte inferior del tubo. Una vez recogidas ambas poblaciones las células no FR eran de nuevo incubadas con eritrocitos de carnero y pasadas por el gradiente para comprobar la no existencia de linfocitos FR.

En los Falcon quedaban los M-M libres de linfocitos. Los PMN fueron obtenidos tal como se describe en el apartado (II.10.1).

Las células así obtenidas fueron infectadas con VPPA para seguir el estudio de la infección "in vitro". (II.14).

## II.8. CARACTERIZACION Y VALORACION DE LINFOCITOS Y MONOCITOS.

Los linfocitos y monocitos fueron caracterizados y valorados en relación a sus receptores de membrana específicos, así se valoró y estudió la técnica de tinción de Esterasa.

### II.8.1. Caracterización y Valoración de Linfocitos formadores de Roseta espontánea.

Los linfocitos FRE se caracterizaron mediante la formación de rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero tratados con Neuroaminidasa.

Para su preparación cinco mililitros de la solución de eritrocitos y Allsever eran lavados tres veces en solución salina estéril (SSE). Tras el último lavado eran resuspendidos en 5 ml. de RPMI 1640, contándose la concentración celular y manteniéndose a 42 C hasta su utilización.

Una vez preparados los eritrocitos, un volumen de 0,5 ml de linfocitos totales (II.7), con una concentración de  $10^6$  linfocitos/ml, fueron mezclados con 0,5 ml de eritrocitos de carnero cuya concentración era de  $6 \times 10^7$ /ml incubándose durante 5 minutos a 37 C, fueron posteriormente centrifugados a 750 rpm (175 x g) durante 7 minutos. Tras una incubación posterior, durante toda la noche a 42 C, se homogeneizaron lenta y cuidadosamente añadiéndoles seguidamente 0,1 ml de una solución al 0,01% de naranja de acridina. Transcurrido este tiempo, se tomó una gota de cada muestra, colocándose en un portaobjetos; estos, tras ser cubiertos, eran observados en un microscopio de fluorescencia y luz ordinaria.

Para obtener el porcentaje de linfocitos FRE con

respecto a linfocitos totales, fueron contadas un total de 200 células (rosetas, no rosetas), hallándose la relación de rosetas y linfocitos totales.

#### II.8.2. Caracterización de linfocitos con Inmunoglobulinas de Superficie.

Los linfocitos IS fueron caracterizados mediante la detección con sueros fluorescentes de las inmunoglobulinas de superficie que se encuentran en este tipo de linfocitos. De 10 a 20 x 10<sup>6</sup> linfocitos totales por mililitro (II.7) fueron lavados dos veces en una solución de PBS-BSA (5 grs/100 ml) despreciándose el sobrenadante del último lavado.

Sobre el sedimento eran colocados 0,50 ml de un suero de conejo anti Ig de cerdo a su dilución óptima (Cappel, 1/5), resuspendiéndose mediante una pipeta Pasteur siliconada. Se incubaron a continuación en un baño de hielo durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron dos veces en PBS-BSA, centrifugándose a 750 rpm (175 x g) durante 8 minutos. Tras el último lavado, se recogía, mediante una pipeta Pasteur siliconada, una gota del sedimento y, colocada en un portaobjetos de fluorescencia, se dejaba secar al aire y se fijaba en alcohol etílico al 95% durante 15 minutos. A continuación se lavaba el porta dos veces en PBS, quedando la preparación lista para su montaje y observación al microscopio de fluorescencia y ordinario.

La valoración se realiza de forma semejante que para los linfocitos FRE, contándose 200 células -- (fluorescencia, no fluorescencia) hallándose la relación entre las células fluorescentes y las no fluorescentes.

### II.8.3. Tinción específica para Linfocitos (FRE, IS) y Monocitos.

Como tinción específica para la diferenciación y valoración de linfocitos T, B y monocitos, se utilizó el método de las esterasas, recientemente descrito por Lagotent et al (1978).

Las extensiones de sangre de cada animal eran fijadas en una solución de bufer fosfato, acetona y formol durante varios segundos, 30 exactamente. Seguidamente se lavaban todas las preparaciones con agua destilada durante algunos segundos, dejándose secar al aire a temperatura ambiente. A continuación, las preparaciones se teñían con las soluciones (a, b, c) durante 45 minutos, siendo lavados posteriormente 4 veces con agua destilada. Como tinción de contraste se utilizó el verde metilo al 1% el cual, se dejaba actuar durante 8 minutos. Tras esta última fase, las preparaciones eran lavadas varias veces con agua destilada y, dejándose secar al aire, eran montadas con Permunt y observadas al microscopio.

## II.9. ESTIMULACION INESPECIFICA Y ESPECIFICA "IN VITRO" DE LOS LINFOCITOS.

Se utilizó la técnica de la blastogénesis (transformación linfocitaria) para estudiar la capacidad de respuesta de base celular, tanto a los mitógenos (estimulación inespecífica) como a los antígenos PPA (estimulación específica), en todos los animales antes y después de la inoculación con los diferentes virus, así como a lo largo de todo el experimento.

Esta técnica, que ha sido utilizada para el estudio de la respuesta celular en otras especies, Sánchez-Vizcaino et al, (1979), Moreno López (1977), está considerada como el test más sensible para el estudio "in vitro" de este tipo de respuesta inmune. D. Marker et al, (1976).

Varios autores, Rigal, Elsasser y Hecht (1970) han comprobado que para obtener una perfecta inducción blástica hay que conocer una serie de parámetros tales como tiempo óptimo de incubación, tipo y concentración de mitógenos y tiempo y concentración de los inductores específicos. Dado que éstos parámetros varían según la especie, fueron primeramente estudiadas las condiciones óptimas en la especie porcina, utilizándose animales normales.

Linfocitos de cerdos normales (II.7) en concentraciones de  $2 \times 10^6$  linfocitos/ml se estimularon con PHA, LPS y PWM a diferentes concentraciones y tiempos de incubación (tabla II.1) con el fin de encontrar los óptimos para esta especie. Observándose los índices máximos de estimulación a la concentración de 0,5 mg/ml para LPS, PHA y 1 mg/ml para PWM y todos ellos a las 72 horas de incubación.

### II.9.1. Preparación de los cultivos

El medio de cultivo utilizado en la estimulación "in vitro" consiste en RPMI-1640 suplementado

T A B L A    I I   -   1

ESTUDIO DE LA CONCENTRACION Y TIEMPOS  
DE INCUBACION DE LOS MITOGENOS.

CONCENTRACION mg/ml	INCUBACION horas	P H A CPM	P W M C P M	L P S C P M
0,12	24	$1 \times 10^3 \pm 300$	$0,8 \times 10^3 \pm 200$	$150 \pm 10$
0,25	48	$25 \times 10^3 \pm 5 \times 10^3$	$15 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$	$4 \times 10^3 \pm 500$
0,50	72	$50 \times 10^3 \pm 10 \times 10^3$	$30 \times 10^3 \pm 5 \times 10^3$	$10 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$
1	72	$45 \times 10^3 \pm 10 \times 10^3$	$40 \times 10^3 \pm 5 \times 10^3$	$7 \times 10^3 \pm 500$
1	96	$35 \times 10^3 \pm 8 \times 10^3$	$30 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$	$6 \times 10^3 \pm 1 \times 10^3$
2	120	$20 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$	$15 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$	$2 \times 10^3 \pm 100$

PHA:    FITOHEMAGLUTININA  
 PWM:    POKEWEED  
 LPS:    LIPOPOLISACARIDO E. COLI.  
 CPM:    CUENTAS POR MINUTO.

con el 20% de FCS, 2 mM de glutamina, 10 mM de Hepes, 100 UI/ml de penicilina, 100 microgramos/ml de estreptomycin y 50 UI/ml de micostatin. Las condiciones para la incubación son de 37°C en atmósfera húmeda y con el 5% de CO<sub>2</sub>.

Se prepararon cultivos por triplicado para cada mitógeno, en placas de microtitulación estériles, conteniendo  $2 \times 10^5$  linfocitos por pocillo en 0,050 ml de medio de cultivo. Los mitógenos se depositaron en cada pocillo a sus concentraciones óptimas, en volúmenes de 0,10 ml/pocillo. Después se incubaba durante 72 horas.

Como controles para la estimulación con mitógenos se utilizaron los mismos linfocitos, a los que se añadían 0,10 ml de RPMI-1640 sin FCS.

#### II.9.2. Incorporación de Timidina tritiada.

La activación inducida en los cultivos "in vitro" se determinó por la proliferación celular evidenciada por la incorporación de Timidina tritiada.

Dieciocho horas antes de cumplirse las 72 horas de incubación eran añadidos 2,5  $\mu$ Ci de Timidina tritiada a cada pocillo de la placa de microtitulación.

Los cultivos se filtraron a través de fibra de vidrio (Reeve Angel) utilizando un colector múltiple Mash II. Los filtros eran recogidos y transferidos a viales apropiados, siendo secados a 37°C durante 30 minutos. Seguidamente se depositaban, en cada vial, 2 ml de líquido de centelleo siendo



transferidos a un contador de centelleo líquido para su conteo.

#### II.9.3. Interpretación de los resultados

Los resultados se expresan como índices blásticos (IB), que se obtienen mediante el cociente de las CPM de los linfocitos estimulados y las CPM de los linfocitos control. Esta operación se realiza para cada uno de los mitógenos.

#### II.9.4. Preparación del Antígeno

Para estudiar la inducción blástica específica fue preparado un antígeno de PPA a partir de cada inóculo vírico (II.5.1.) tras su inactivación mediante exposición a la luz ultravioleta.

Se utilizaron diferentes diluciones de cada inóculo (1/5, 1/10, 1/50) en RPMI -1640. Tres mililitros de cada dilución eran colocados en una placa de Petri de 6 cm de diámetro en la cual, se había depositado una barrita magnética para su continua agitación durante los 5 minutos que eran expuestos a la luz ultravioleta. se utilizó como lámpara una E-Sylvania G15TS, situada a 20 cm de la placa Petri.

Tras la inactivación de las diferentes diluciones, estas fueron estudiadas mediante la técnica de la hemoadsorción (II.5.2.) comprobándose así que la citada inactivación había sido total.

De las diferentes diluciones de los antígenos preparadas se utilizó la de 1/10 por ser la más significativa.

El antígeno, una vez preparado, se conservó a -20° C hasta su posterior uso.

#### II.9.5. Estimulación específica "in vitro".

Se prepararon cultivos por triplicado en placas de microtitulación estériles, conteniendo  $2 \times 10^5$  linfocitos por pocillo (II.7.1.), añadiéndose 0,10 ml de la dilución 1/10 del antígeno PPA (II.9.4.). Después se incubó a 37° C, en atmósfera húmeda, con el 5% de CO<sub>2</sub> durante 96 horas, por ser este el tiempo óptimo para la estimulación específica.

Como controles se utilizaron linfocitos de cerdos normales (no inoculados), a igual concentración ( $2 \times 10^5$ /pocillo) más 0,10 ml del antígeno 1/10 de PPA. La incorporación de Timidina tritiada se realizó de la misma forma que para los mitógenos (II.9.2).

#### II.9.6. Valoración de la estimulación específica

Los resultados también fueron expresados como índices blásticos, obteniéndose en este caso mediante el cociente de las CPM de los linfocitos de animales inoculados y las CPM de los linfocitos normales o controles.

## II.10. ESTUDIOS DE FAGOCITOSIS.

La capacidad fagocítica de los macrófagos y los polimorfonucleares fue puesta de manifiesto por microscopía y liberación enzimática, tras la incubación de estas células con partículas de Latex y Zymosan.

### II.10.1. Obtención de Monocitos y Polimorfonucleares.

La obtención de monocitos-macrófagos (M-M) se realizó tras la centrifugación de sangre total en Lymphomedix (II.7) lavándose dos veces en solución de lavado de fagocitosis (SLF) a 1.000 rpm (180 x g) durante 8 minutos, observándose seguidamente la viabilidad (azul de tripano al 0,02%) y concentración celular.

para la obtención de polimorfonucleares - (PMN) se utilizó el sedimento de eritrocitos formado en la separación de linfocitos y monocitos (II.7).

Con una pipeta Pasteur se recogió la superficie de dicho sedimento, transfiriéndola a un tubo de centrifuga con SLF. Se centrifugó a 500 x g durante 15 minutos, recogiendo mediante una pipeta Pasteur la parte superior del sedimento, a la que se añadió 2,5 volúmenes de gelatina al 2,5% por cada volumen celular recogido. Esta mezcla fue homogeneizada, dejándose reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo el sobrenadante era recogido mediante una pipeta Pasteur y centrifugado a 1500 rpm (200 x g) durante 10 minutos y lavándose seguidamente dos veces en SLF a 1500 rpm durante dos minutos.

Con el fin de eliminar los eritrocitos todavía presentes en el sedimento de PMN, se trata -

ron mediante choque hipotónico con agua destilada durante 30 segundos, siendo neutralizado este efecto con solución salina al 3,5%. Después se vuelven a lavar los PMN en SLF, observándose la viabilidad (0,02% de azul de tripano) y concentración celular.

#### II.10.2. Fagocitosis de partículas de Latex

Se tomaron 0,1 ml de la suspensión de Latex añadiéndose a una solución de FCS al 10% en SS posteriormente se centrifugó a 1500 rpm (200 x g) durante 15 minutos. Las partículas de Latex se resuspendieron en 1 ml de una solución de FCS SS. De este Latex así preparado se tomaron 0,1 ml, añadiéndose a una concentración celular de  $10^7$ /ml de polimorfonucleares y monocitos (II.9.1) incubándose a 37° durante 45 minutos. Las células se centrifugaron a 425 x g durante 10 minutos, observándose al microscopio, considerándose como fagocitosis positiva, tanto para polimorfonucleares como para monocito-macrófago, aquellas células que hubieran ingerido más de 8 partículas. El sobrenadante de esta centrifugación se congeló a -20° C hasta su posterior uso (II.10.4).

#### II.10.3. Fagocitosis de partículas de Zymosan

A 20 ml de solución salina (ss) se añadieron 200 mg de Zymosan, sometiéndose la mezcla a ebullición durante 30 minutos, lavándose a continuación tres veces en SLF. El sedimento obtenido tras el último lavado se resuspendió en 20 ml de SS, distribuido en viales a razón de 1 ml por vial (10 mg de Zymosan) y congeladas a -20° C hasta su utilización.

para su utilización era descongelado uno de los viales al que se añadió 1 ml de suero fresco de

cerdo (Zymosan opsonizado) incubándose a 37° C durante 30 minutos. A continuación, era lavado - 5 veces en SLF, resuspendiéndose el sedimento en 0,8 ml de solución de incubación de fagocitosis (SIF).

Los pasos seguidos a partir de este momento - son idénticos a los de la fagocitosis con Latex, considerando, en este caso, fagocitosis positiva en una célula a la ingestión de 3 ó más partículas de Zymosan.

#### II.10.4. Estudios enzimáticos

Como enzimas específicas liberadas durante la fagocitosis, se estudió la concentración de b-glucuronidasa y fosfatasa ácida en los sobrenadantes obtenidos anteriormente (II.10.2.), según el método descrito por Lindhardt et al, (1965). En breve descripción, la técnica para la determinación de la fosfatasa ácida se realizó tomando 0,10 ml del sobrenadante muestra al que se le añaden 1 ml de tampón citrato 0,1 M pH 5,6 y 0,03 ml de paranitro fenil fosfato 0,6 M, incubándose a 37° C durante 16 horas. La reacción era frenada mediante la adición de 2 ml de NaOH 0,5 N, leyéndose a 405 nm de densidad óptica, entre los 15 y 30 minutos posteriores al frenado. El blanco era ajustado a 100 de transmitancia.

La b-glucuronidasa fue determinada tras la incubación a 37° C durante 15 minutos de 0,5 ml del sobrenadante muestra (II.10.2.) con 0,1 ml de fenoltaleína glucoronada (10 nM). Seguidamente se lee a 540 nm de densidad óptica, expresándose la liberación de enzima en microgramos de fenoltaleína.

## II.11. DETERMINACION DEL COMPLEMENTO.

La determinación de la capacidad hemolítica del Complemento ( $\text{CH}_{50}$ ) fue determinada según la técnica descrita por Mayer en 1961 y modificada por Grant, et al en (1977). En resumen, las muestras de sangre fueron tratadas con EDTA a la concentración final de 0,01 M para liberar el complemento unido a los complejos inmunes circulantes. Después de centrifugar a 40° C, el suero era separado y congelado a -70° C. Para realizar la prueba se usan tres tubos por cada muestra, siendo el volumen final de 1,5 ml por tubo compuestos por 0,5 ml de  $5 \times 10^7$  eritrocitos de carnero sensibilizados en bufer veronal, con 0,1 unidades de heparina/ml. Los eritrocitos eran sensibilizados mediante la incubación de  $1 \times 10^9$ /ml en un volumen igual de homolisina (1:500) durante 30 minutos a 37° C. A los tres tubos antes mencionados se les añadía, a 0° C 0,1 ml, 0,5 ml y 1,0 ml del suero problema diluido en bufer veronal-heparina y, seguidamente un volumen igual de eritrocitos ya sensibilizados hasta conseguir un volumen final de 1,5 ml. Después de incubar durante 1 hora a 37° C, se añadía más bufer veronal-heparina hasta un volumen de 5 ml por tubo. Se realizó una centrifugación a 800 x g y el sobrenadante es leído en un espectrofotómetro a 412 nm. El 100% de hemolisina standard utilizada consistía en 0,5 ml de eritrocitos sensibilizados tratados con 4,5 ml de una solución de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 0,1%.

## II.12. MEDIADORES DE LA ANAFILAXIA

Como mediador de la Anafilaxia se estudió la liberación del Factor de Activación de las Plaquetas (PAF), - ya que juega un papel inmunopatológico muy importante en las reacciones inmunes del tipo I y III. Recientemente - se ha puesto de manifiesto que la liberación de PAF no - sigue el mismo mecanismo en todas las especies, Benveniste J. (1974), siendo en unas liberado fundamentalmente - como consecuencia de una reacción de tipo I, Benveniste et al, (1972) y otras, como resultado de la fagocitosis, Sánchez Crespo et al, (1980).

### II.12.1. Valoración del Factor de Activación de las Plaquetas mediante la reacción antígeno PPA-IgE de los Basófilos.

La valoración de PAF mediante la reacción Antígeno PPA-IgE se realizó siguiendo el método - descrito por Benveniste et al, (1974). A modo de resumen, 3 ml de sangre fueron extraídos de cada animal (inoculados y controles) por punción en la vena cava; se colocaron en un tubo de plástico que contenía 0,5 ml de una solución ACD - (Acid Citrate Dextrose). De la sangre así obtenida se tomó 1 ml que era incubado en un tubo de plástico, con un microlito de Serotonina tritida, a 37° C durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo se centrifugó a 800 x g durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sedimento era - posteriormente lavado, primero, en una solución de gelatina en Tyrode (0,1 mM de EGTA pH 6,5) y, después, en la misma solución sin calcio (pH 6,5). A continuación se suspendía en 1 ml de una solución de gelatina de Tyrode con Calcio (pH 7,2), quedando las células preparadas para su incubación.

### II.12.2. Incubación con el Antígeno específico.

Como antígeno específico de PPA se utilizó - el descrito anteriormente (II.9.4.), a la dilución de 1/5, por ser esta la más idónea, en un volumen de 0,1 ml por cada 0,1 ml de la sangre anteriormente preparada (II.12.1), incubándose a 37° C durante 15 minutos y en agitación continua.

Los controles utilizados fueron:

- a) Como control de máxima liberación de serotonina tritiada se tomó 0,1 ml de la misma sangre más 0,1 ml de trombina (10 UI/ml).
- b) Como control de fondo se utilizó 0,1 ml de la misma sangre más 0,1 ml de la solución de gelatina en Tyrode.

Se incubaron en las mismas condiciones que para el antígeno, realizándose todos los pasos por duplicado.

Terminada la incubación, se centrifugaron todos los tubos a 800 x g durante 15 minutos. Del sobrenadante de cada tubo se tomaron 0,05 ml que fueron depositados en viales apropiados que contenían 2,5 ml líquido de centelleo, llevándose seguidamente al contador de partículas Beta, realizándose la lectura.

### II.12.3. Interpretación de los resultados.

Se consideró como liberación positiva de Serotonina tritiada a aquellos valores que excedían -



en más de un 10% de los obtenidos con el control de fondo (II.12.2.), siendo el valor máximo -- (100%) el producido mediante la incubación de - Trombina, expresándose todos los valores en por centajes de liberación del isótopo.

II.12.4. Valoración de Factor de Activación de las Plaquetas inducido por Fagocitosis mediante agregación plaquetaria.

Se estudió la liberación de PAF de monocitos macrófagos y polimorfonucleares (tanto de animales sanos como inoculados), tras su incubación - con partículas de Latex y Zymosan (II.10.2.), por agregación plaquetaria siguiendo la técnica descrita por Benveniste et al, (1977).

II.12.5. Obtención y preparación de las plaquetas.

Las plaquetas utilizadas para la agregación plaquetaria fueron obtenidas tras punción arterial de un conejo preparándose según el método descrito - por Aster et al, (1972). La técnica, brevemente descrita, consiste en la separación de las plaquetas por centrifugación a 1.200xg durante 15 minutos, re suspendiéndose en un tampón de Tyrode EGTA, lavándose seguidamente dos veces en el mismo tampón. Se tomó una concentración de  $5 \times 10^7$  plaquetas en - tris-gelatina (pH 7,5), añadiéndose a esta concentración 0,05 ml de los sobrenadantes problema, - (II.10.2.). La agregación plaquetaria se midió mediante un agregómetro.

II.12.6. Interpretación de los resultados

Los resultados son expresados en unidades PAF

obtenidas mediante la fórmula siguiente:

$$\frac{1}{\text{ml de sobrenadante problema}} \times 1.000 = \text{unidades PAF/ml}$$

Sabiéndose que una unidad PAF es aquella que -  
produce el 50% de agregación plaquetaria con 5 ml  
de trombina.

### II.13. INMUNOPATOLOGIA. DESPOSITO DE INMUNOCOMPLEJOS.

Debido a la cronicidad que presentaron algunos animales inoculados con el virus, encontrándose simultáneamente anticuerpos y viremia, se hicieron estudios para poner de manifiesto la posible existencia de inmunocomplejos, en los tejidos obtenidos al sacrificio, mediante inmunofluorescencia.

#### II.13.1. depósitos de IgG en Riñón de cerdo.

Los tejidos fueron obtenidos del riñón inmediatamente después de la muerte del animal, haciéndose unos cortes de 8 mm de espesor, introduciéndose en nitrógeno líquido durante 15 segundos y conservándose a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

Mediante un microtomo de congelación, se efectuaron cortes de entre 2 y 4 micras de espesor, colocándose en un portaobjetos y lavándose tres veces durante 5 minutos cada vez en PBS (0,01 M pH 7,4) en agitación continua.. Tras secarse al aire, se cubren los tejidos con un suero de conejo anti IgG de cerdo marcado con fluoresceína (Cappel 1/5) incubándose a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo las preparaciones son lavadas tres veces en PBS, secadas al aire y montadas con glicerina, observándose al microscopio la fluorescencia.

#### II.13.2. depósitos de $\text{C}_3$ en riñón de cerdo.

La técnica utilizada para la detección de la fracción  $\text{C}_3$  del complemento es la misma que la usada para la detección de IgG, variando únicamente el conjugado. En este caso se utilizó un suero de conejo anti  $\text{C}_3$  de cerdo marcado con fluo

- resceina (Cappel 1/8).

II.13.3. Depósitos de antígeno PPA en riñón de cerdo.

La técnica utilizada es idéntica a la de los apartados II.12.1 y II.12.2, siendo en este caso el conjugado un suero de conejo antiantigено de VPPA (INIA 1/4).

#### II.14. ESTUDIO DE LA INFECCION "IN VITRO" DE LAS CELULAS DEL - SISTEMA INMUNE.

Los linfocitos T y B así como los M-M y los PMN obtenidos de cerdos controles tal como se describió en los apartados (II. 7) y (II.10.1) fueron infectados con VPPA siguiendo la infección mediante la técnica de la inmunofluorescencia directa, Boulanger et al, (1967) y la hemoadsorción según Malmquist y Hay, (1960).

Las células FR, no FR, M-M y PMN eran ajustadas a la proporción de  $10^6$  células/ml en tubos Leighton. El medio de cultivo utilizado fue RPMI-1640 suplementado con el 15% de FCS el volumen total era de 1,5 ml por tubo. La infección se llevó a cabo retirando todo el medio de los tubos y añadiendo 0,2 ml de virus ( $10^5$  UHA<sub>50</sub>) por tubo e incubados durante dos horas a 37° C. Tras la incubación 1,3 ml de medio completo eran añadidos a cada tubo siendo uno de los tubos analizados para conocer la cantidad de virus inicial. Otros tubos fueron analizados a las 24, 48, 72 y 96 horas post infección.

### III. RESULTADOS.

#### III.A. ANIMALES INOCULADOS CON EL VIRUS ESPAÑA 75.

##### III.A.1. Estudio de la infección

Todos los animales inoculados con el virus atenuado España 75 fueron analizados antes y durante la infección. Se estudiaron sus constantes fisiológicas, de importancia para el estudio inmunológico, durante dos semanas en repetidas ocasiones. Tras la inoculación, se tomaron muestras semanales para ir conociendo la evolución de la infección durante las cinco semanas que duró este experimento.

Del total de los quince animales inoculados, siete fueron sacrificados al final de la experiencia (35 días), tres fueron sacrificados en la segunda semana PI, cuatro murieron con lesiones agudas de PPA a los 14 DPI y finalmente uno murió accidentalmente a los 7 días PI (tabla III.1.)

##### III.A.1.1. Determinación de Viremia y anticuerpos específicos.

Todos los cerdos presentaron viremia desde la primera semana PI y durante todo el experimento (tabla III.2.).

##### III.A.1.2. Determinación de anticuerpos.

Fueron detectados anticuerpos anti PPA en todos los animales, desde la primera semana PI hasta la última. En la primera semana PI presentaron títulos muy bajos (puro IFI, y 1:10 ELI -

T A B L A   I I I   -   1

CERDOS ADULTOS INOCULADOS CON EL VIRUS  
ESPAÑA 75 PARCIALMENTE ATENUADO.

ESTUDIO DE LA INFECCION.

Nº ANIMAL	M, S, SI.	D P I
1295	M	10
1296	S	35
1297	S	35
1299	S	35
1300	M	12
1301	SI	14
1302	M	14
1303	SI	12
1304	MAC	7
1305	M	14
1346	SI	14
1347	S	35
1348	S	35
1349	S	35
1350	S	35
1290 - 1294)	CONTROLES	
1251 - 1253)		
1298 y 1345)		

M = MUERTO  
 S = SACRIFICADO  
 SI = SACRIFICADO "IN EXTREMIS".  
 MAC = MUERTE ACCIDENTAL

T A B L A III - 2

=====

EVOLUCION DE LA VIREMIA EN LOS CERDOS  
INOCULADOS CON EL VIRUS ESPAÑA 75

Nº ANIMAL	0	1	2	3	4	5
1295	NEG.	Pos.	M	...	...	...
1296	NEG.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
1297	NEG.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
1299	NEG.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
1300	NEG.	Pos.	M	...	...	...
1301	NEG.	Pos.	Pos.	M	...	...
1302	NEG.	Pos.	Pos.	M	...	...
1303	NEG.	Pos.	M	...	...	...
1304	NEG.	Pos.	M	...	...	...
1305	NEG.	Pos.	Pos.	M	...	...
1346	NEG.	Pos.	Pos.	M	...	...
1347	NEG.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
1348	NEG.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
1349	NEG.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
1350	NEG.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.
1290 - 1294 1251 - 1253 1345 y 1298	CONTROLES NEGATIVOS					

NEG. = NEGATIVO

Pos. = POSITIVO

M. = MUERTO



T A B L A   I I I   -   3

VALORACION DE LOS NIVELES DE ANTICUERPOS  
ESPECIFICOS EN LOS CERDOS INOCULADOS CON  
EL VIRUS ESPAÑA 75.

SEMANAS PI

Nº CERDO	0	1	2	3	4	5
1295	NEG. PURO		M	...	...	...
1296	NEG. 1/10	1/1020	1/1000	1/1000	1/2000	
1297	NEG. 1/10	1/2000	1/4000	1/8000	1/8000	
1299	NEG. 1/10	1/1000	1/2000	1/16000	1/10000	
1300	NEG. PURO		M	...	...	...
1301	NEG. 1/10	1/10	M	...	...	
1302	NEG. 1/10	1/10	M	...	...	
1303	NEG. PURO		M	...	...	...
1304	NEG. PURO		M	...	...	...
1305	NEG. 1/10	1/10	M	...	...	
1346	NEG. PURO	1/10	M	...	...	
1347	NEG. 1/10	1/2000	1/4000	1/5000	1/3000	
1348	NEG. 1/10	1/1000	1/8000	1/6000	1/2000	
1349	NEG. 1/10	1/3000	1/6000	1/4000	1/2000	
1350	NEG. 1/10	1/2000	1/4000	1/4000	1/2000	

## SEMANAS PI

Nº CERDO	0	1	2	3	4	5
1290-1294	-	-	-	-	-	-
1351-1353	-	-	-	-	-	-
1294y1298	-	-	-	-	-	-

M = MUERTO

TÍTULOS OBTENIDOS MEDIANTE LA TÉCNICA DE  
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

SA) detectándose en la segunda semana títulos superiores, diferenciándose dos grupos de animales, unos - con títulos altos y otros con títulos relativamente bajos (1:10, IFI). Como se puede observar en la tabla III.3., los animales nº 1296, 1297, 1299, 1347, 1348, 1349, 1350, presentaron títulos de anticuerpos superiores a los animales nº 1295, 1300, 1301, 1302, 1303, 1304, 1305 y 1346. Es importante resaltar que los primeros siete cerdos sobrevivieron a la infección. Se observó un pico máximo en el nivel de anticuerpos entre la tercera y cuarta semana PI descendiendo el título sobre la quinta semana (gráfica III.1.).

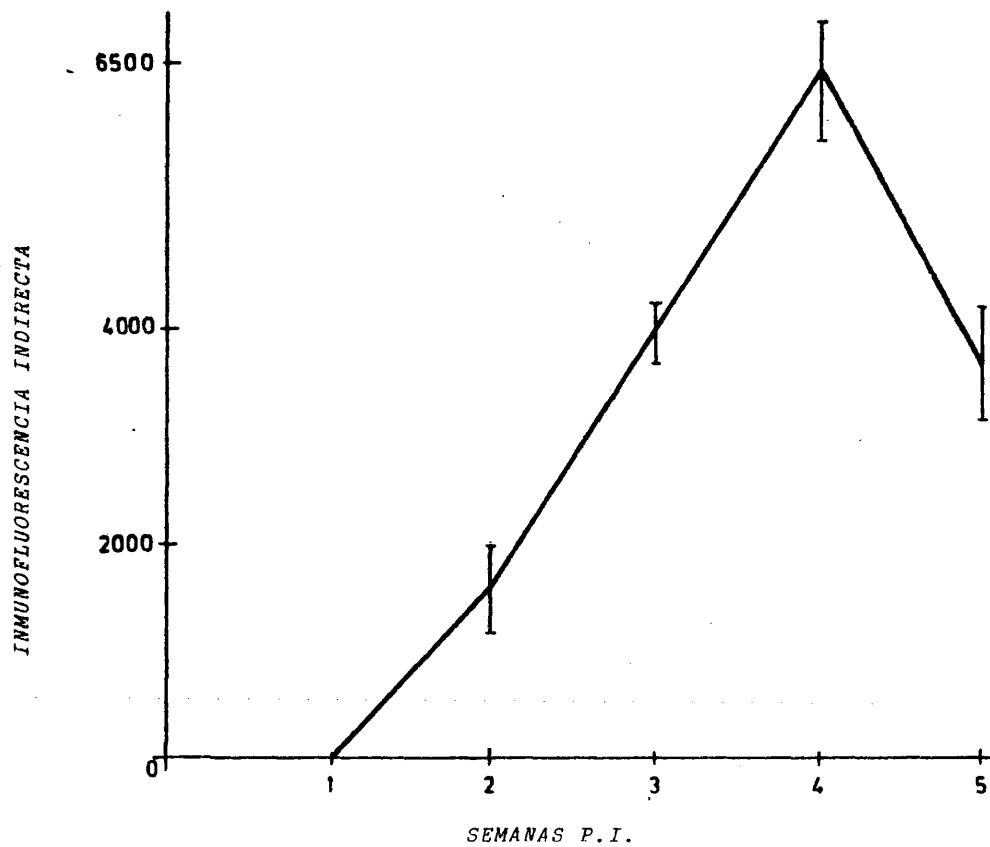
### III.A.2. Estudios Hematológicos.

Se analizaron los parámetros hemáticos más relacionados con la respuesta inmune en todos los animales, tanto en condiciones fisiológicas como - tras la inoculación con el virus.

Los valores medios con sus desviaciones estándar, de estas constantes hemáticas, se expresan - en la tabla III.4. Es de destacar, la homogeneidad de estos valores dentro de las variaciones - propias de esta especie.

#### III.A.2.1. Valoración cuantitativa de Leucocitos y Linfocitos totales.

Los leucocitos y linfocitos totales -

GRAFICA III-1

*Desarrollo de los niveles de anticuerpos en los cerdos inoculados con el virus España 75 atenuado.*

T A B L A III - 4

CONSTANTES INMUNO-HEMATICAS DE LOS ANIMALES DEL GRUPO INOCULADO CON EL VIRUS ESPAÑA 75.

LINFOCITOS TOTALES	13.196	$\pm$ 5.170,88
LEUCOCITOS TOTALES	23.445,45	$\pm$ 5.696,02
LINFOCITOS T	35,77	$\pm$ 3,23
LINFOCITOS B	18,57	$\pm$ 1,12
IB Ag	0,001	$\pm$ 0,00
IB PHA	54,77	$\pm$ 5,96
IB PWM	26,68	$\pm$ 2,87
IB LPS	6,52	$\pm$ 1,05
F F Ac PMN (DO)	2.597,60	$\pm$ 185,38
F F Ac MN (DO)	3.244,00	$\pm$ 624,96

VALORES MEDIOS OBTENIDOS DE TODOS LOS ANIMALES EMPLEADOS EN EL EXPERIMENTO EN CONDICIONES FISIOLÓGICAS:

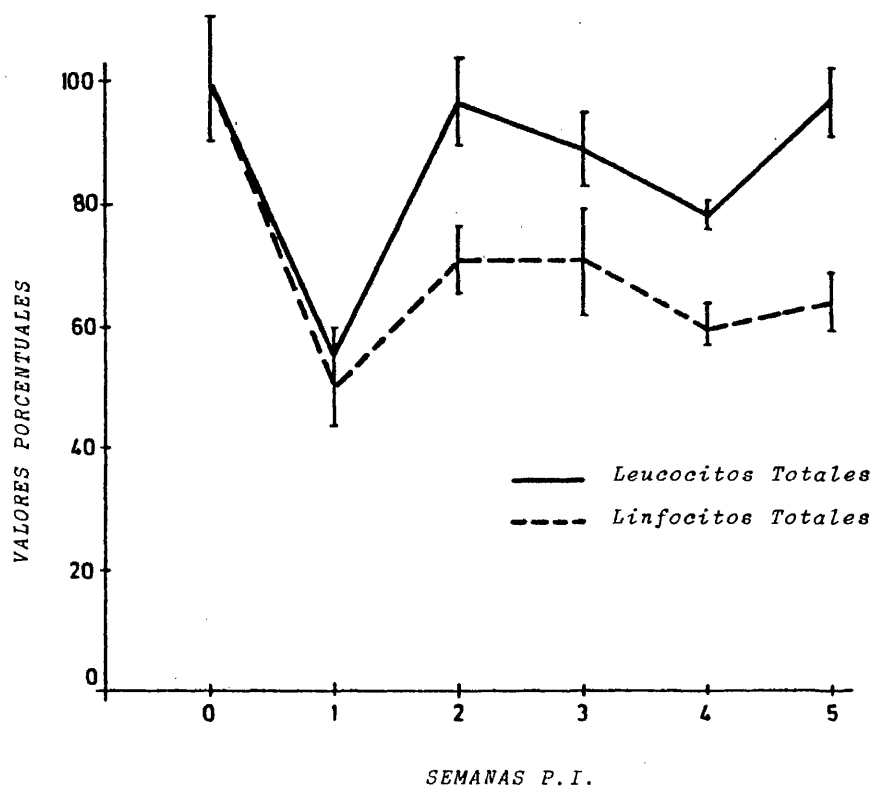
fueron evaluados desde la semana - 0 hasta la V PI. Los resultados, se representan en la gráfica III.2, - en la que se expresan los valores basales medios como 100 obteniéndose los demás realizando las correspondientes relaciones.

En la misma gráfica se representan ambas curvas, siendo de interés destacar su casi perfecto paralelismo a lo largo de las cinco semanas de la experiencia. Es de resaltar, la muy significativa disminución del número de leucocitos y linfocitos (aproximadamente un 60% de los valores pre inoculación), en la primera semana PI apareciendo una ligera recuperación en la II semana para descender fuertemente hacia la IV semana PI, siendo los valores de la V semana muy semejantes a los fisiológicos. La marcada linfoopenia observada en la gráfica III.2 parece deberse principalmente a los linfocitos FR (gráficas III.3 y III 4.).

#### III.A.2.2. Valoración cuantitativa de Linfocitos FR y IS.

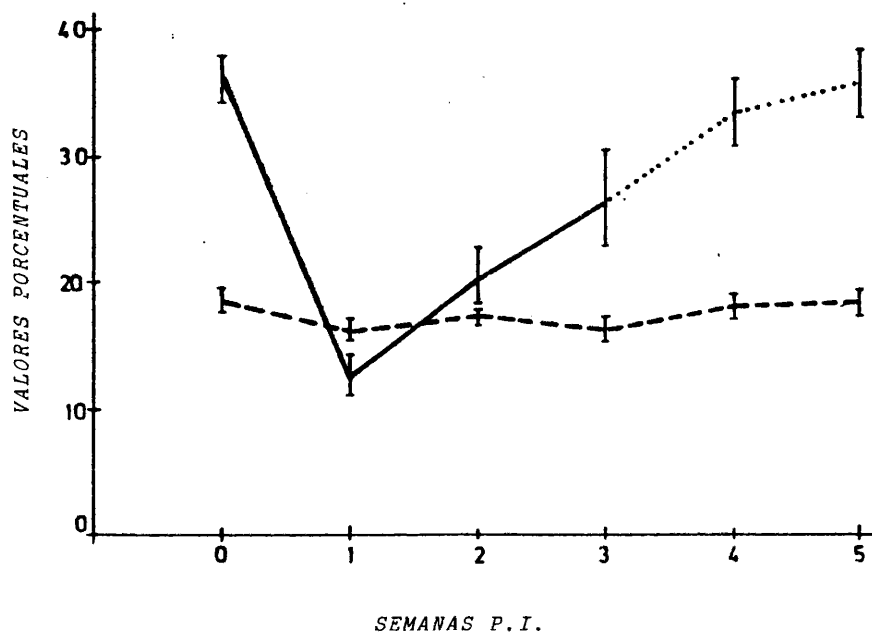
En la gráfica III.3. se representan los valores porcentuales medios de los linfocitos FR e IS de todos los animales inoculados. Se observa una marcada disminución, altamente signi

GRAFICA III-2



Comparación de los leucocitos y linfocitos totales en los cerdos inoculados con el virus España 75 atenuado.

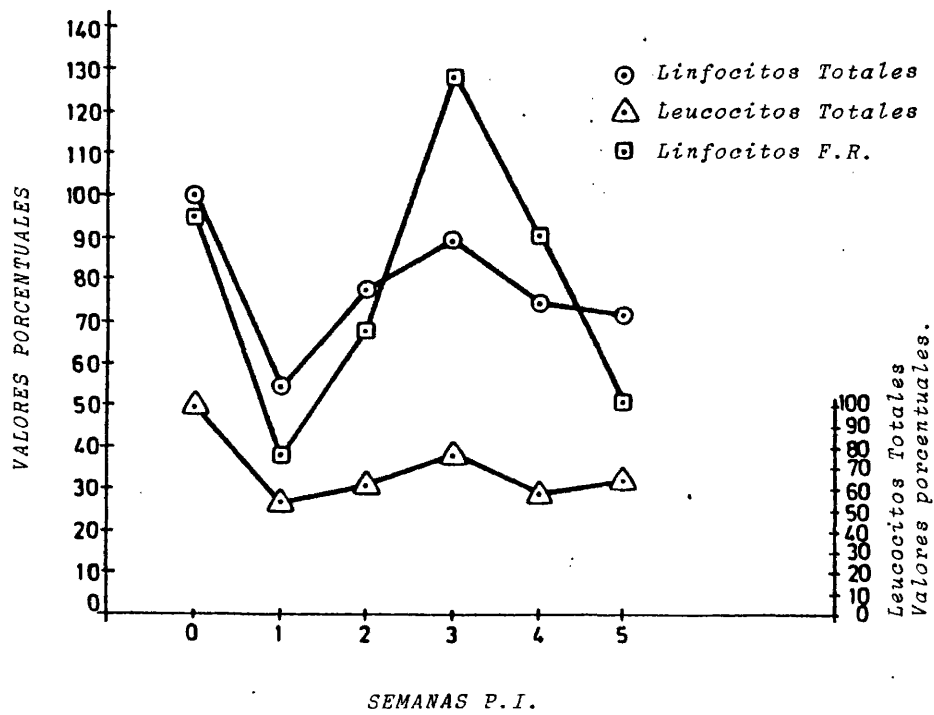
GRAFICA III-3



Valores porcentuales comparativos de los linfocitos FR  
y I.S. en los cerdos inoculados con el virus España 75.



GRAFICA III-4



Comparación de los Linfocitos Totales y F.R., y Leucocitos Totales.

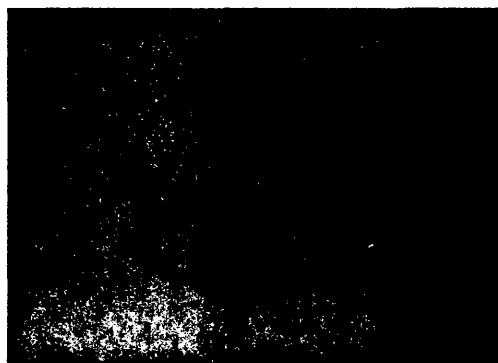
ficativa, en el porcentaje de linfocitos FR en la primera semana - PI, pasando de un  $35,77\% \pm 8,4$  a un  $12,5\% \pm 1,2$  siendo también inferiores a los normales los valores obtenidos en la II y III semana PI, aunque iniciándose un ligero incremento, presentándose en la V semana unos valores prácticamente fisiológicos.

Por otra parte, los valores medios cuantitativos de los linfocitos IS no presentaron variaciones significativas a lo largo de la experiencia.

### III.A.2.3. Análisis mediante la tinción de Esterasas.

En las fotografías III-1 y III-2 se pueden observar las diferentes formas con las que se tiñen los Linfocitos FR e IS, así como los M M mediante la tinción de Esterasas. Dado que esta técnica es mucho más rápida y cómoda que el análisis celular mediante los receptores específicos, se estudió la posibilidad de su utilización para la cuantificación de Linfocitos FR e IS. Sin embargo, los resultados obtenidos demostraron la falta de paralelismo entre ambos métodos, siendo generalmente los porcentajes obtenidos inferiores mediante

FOTOGRAFIAS III - 1 y 2



*Linfocitos FR e IS teñidos por la técnica de Es-  
teradas trds la incubación con eritrocitos de car-  
nero tratados con Neuroaminidasa. Obsérvese la  
reacción positiva en la superficie de los linfo-  
citos FR.*

la técnica de Esterasa que con el análisis de los receptores para eritrocitos de carnero ó la presencia de inmunoglobulinas de superficie (IS). Además, no se observó ninguna relación estadística significativa.

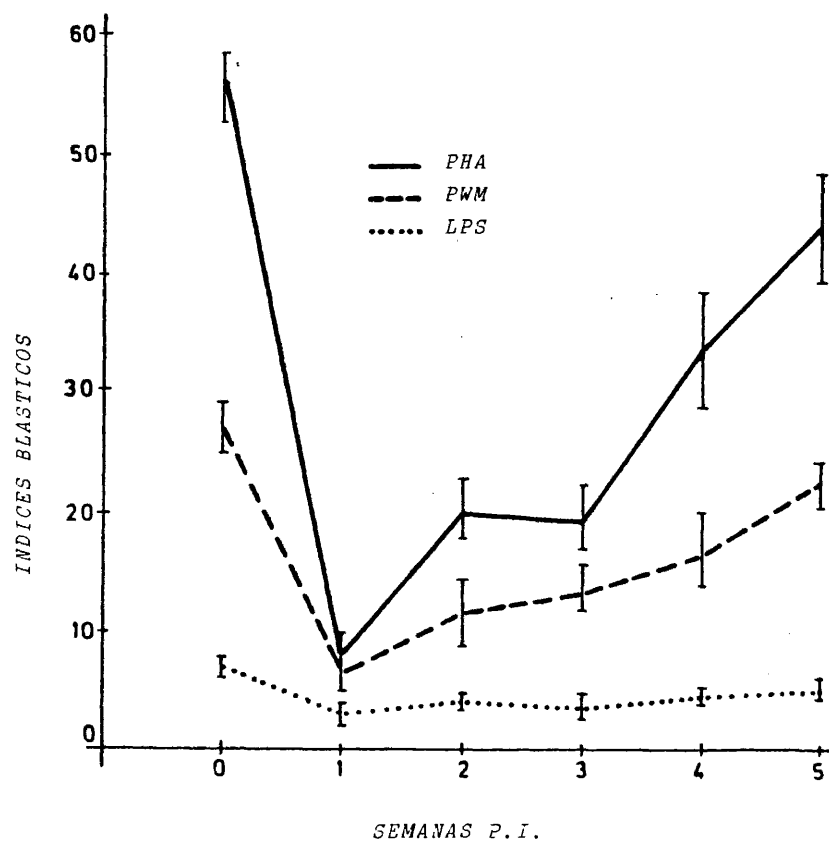
III.A.3. Cambios funcionales de la respuesta Linfocitaria "in vitro" inducida por Mitógenos y Antígeno PPA.

Semanalmente se estudió la estimulación "in vitro" de las diferentes poblaciones linfocitarias mediante el estudio de la inducción blástica con PHA, PWM y LPS, al igual que con el antígeno específico del virus PPA.

III.A.3.1. Respuesta a mitógenos (PHA, PWM y LPS).

En la gráfica III-5 se representan los valores medios porcentuales obtenidos tras la inducción blástica con PHA, PWM y LPS. Se observa una depresión muy significativa en la respuesta frente a PHA y PWM a lo largo de toda la experiencia, alcanzando esta depresión sus valores más bajos en la I, II y III semana PI. Así pasamos de índices blásticos fisiológicos para PHA de  $54,77 \pm 5,96$  a valores de  $7,09 \pm 4,25$  (I),  $19,70 \pm 4,16$  (II) y  $18,97 \pm 5,33$  en la III semana respectivamente.

GRAFICA III-5



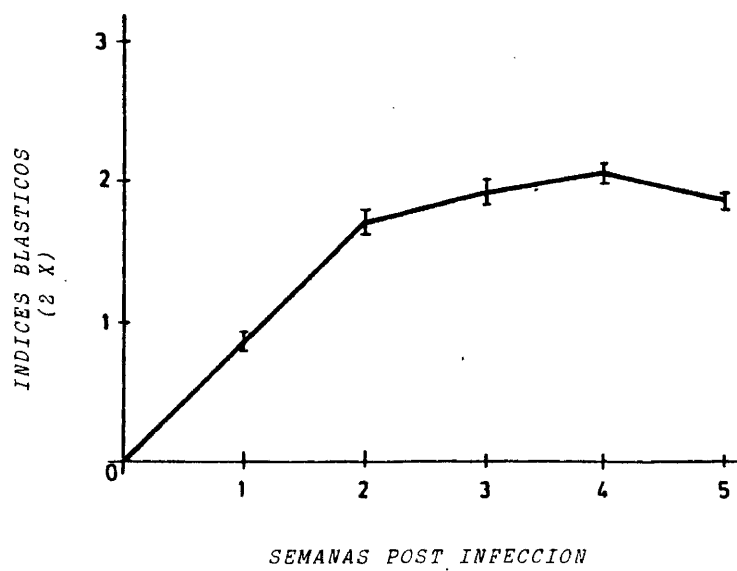
*Respuesta blástica a mitógenos de los Linfocitos  
de cerdos inoculados con España 75.*

Semejante situación se produce en la respuesta frente a PWM, pasando de índices blásticos fisiológicos de  $26,68 \pm 2,87$  a  $6,26 \pm 2,89$ ;  $11,96 \pm 5,79$  y  $13,13 \pm 3,72$  durante la I, II y III semana PI. Por otra parte, también se observó una ligera depresión en la respuesta frente a LPS, aunque en este caso, menos marcada que en los anteriores, así de valores fisiológicos medios de  $6,25 \pm 1,05$  se pasaron a índices de  $3,14 \pm 1,70$ ,  $4,25 \pm 1,43$  y  $3,91 \pm 1,81$  en la I, II y III semana PI respectivamente.

#### III.A.3.2. Respuesta al PPA Antígeno

Al igual que en la inducción blástica por mitógenos, se valoró la blastogénesis inducida por el antígeno específico del virus de la PPA. En la gráfica se representan los valores medios obtenidos con el antígeno. Es de resaltar que los valores, aunque crecientes, no presentan índices blásticos significativos hasta la tercera semana PI ( $3,97 \pm 1,82$ ). El pico máximo aparece en la cuarta semana con valores de  $7,33 \pm 2,11$  (gráfica - III-6.)

#### III.A.3.3. Valores comparativos entre el número de Linfocitos FRE y su capa-

GRAFICA III-6

*Respuesta blástica al antígeno de PPA de  
los cerdos inoculados con el virus  
España 75.*

cidad funcional frente a PHA.

Dado que la PHA induce la estimulación blástica en los linfocitos T, Anderson et al, (1972) y Bloom et al, (1976) y estas mismas células han sido definidas como formadoras de rosetas espontáneas con los eritrocitos de carnero, Brain et al, (1971) Kim et al, (1974), comparamos ambos resultados para comprobar si existía algún grado de semejanza.

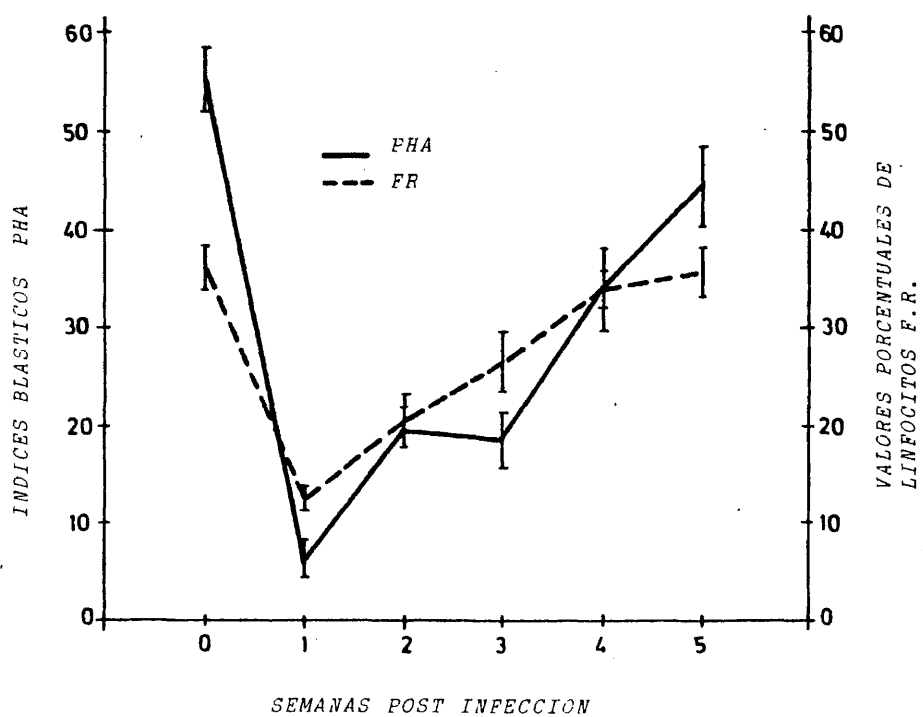
En la gráfica III.7. se representan los valores medios obtenidos con la estimulación de PHA y el porcentaje de las células formadoras de roseta, comprobándose que ambos parámetros presentan una enorme similitud (altamente significativa) en sus resultados.

III.A.3.4. Valores comparativos entre el número de Linfocitos IS y su capacidad funcional frente a LPS.

Ha sido ampliamente descrita la acción selectiva del lipopolisacárido LPS sobre los linfocitos B Buschman et al, (1980), Symon S.D.B (1980) característica específica de estos linfocitos la presencia de inmunoglobulinas de superficie, Binns et al, (1974) y Higgins (1981). Por estos motivos se compararon ambos parámetros (gráfica III.8.) observándose un paralelismo

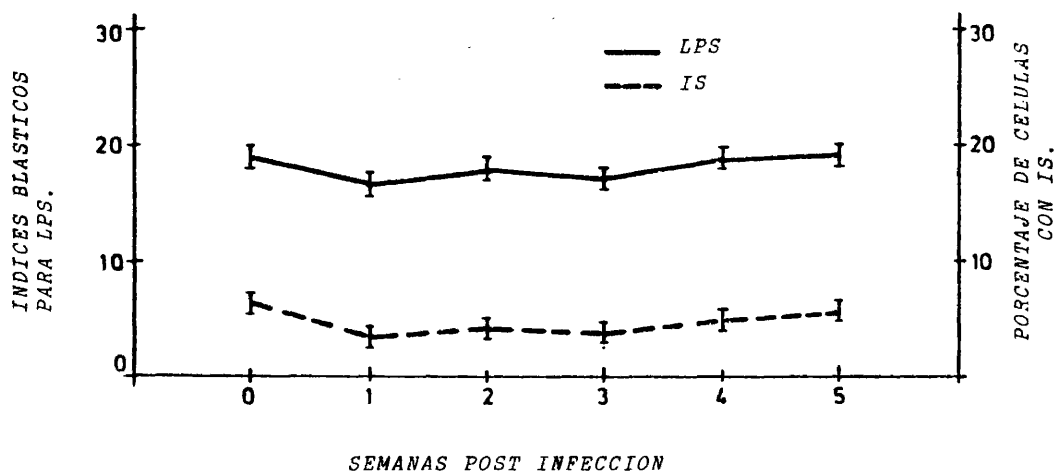


GRAFICA III-7



Valores comparativos entre los linfocitos F.R.,  
su capacidad funcional a PHA.

GRAFICA III-8



Valores comparativos entre el número y la capacidad funcional de los linfocitos B de los cerdos inoculados con el virus España 75.

casi total en sus resultados de -  
toda la experiencia.

III.A.4. Diferencias inmunológicas entre los animales -  
muertos y sobrevivientes a la infección.

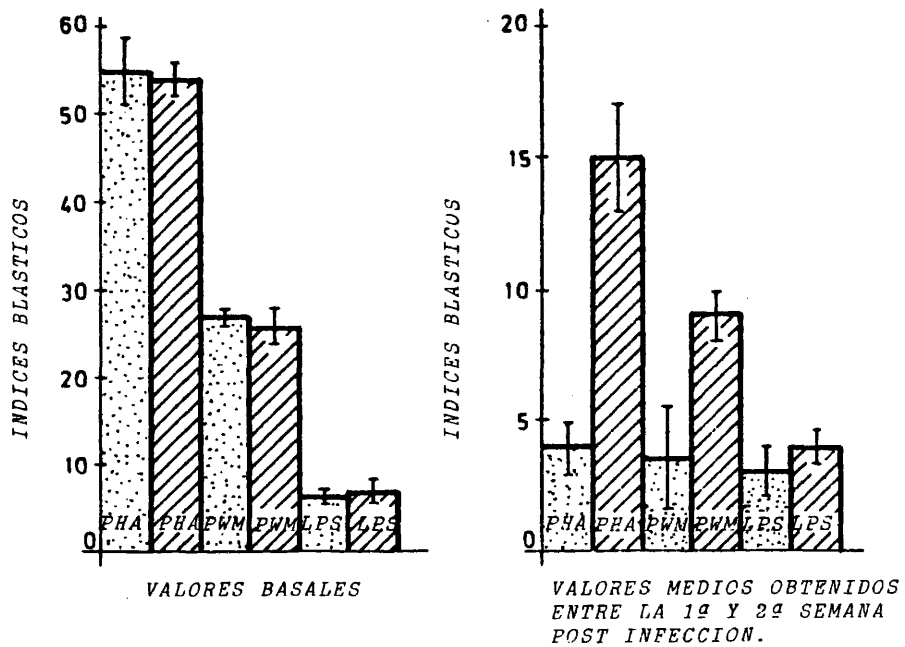
Es importante resaltar las diferencias inmunoló -  
gicas (humorales y celulares) entre los anima -  
les que murieron durante la primera semana PI,  
con lesiones típicas de PPA aguda de aquellos  
que sobrevivieron a lo largo de toda la expe -  
riencia.

En la gráfica III.3. se muestran los títulos  
(IgG) frente al virus de la PPA en ambos grupos,  
durante la primera semana PI. Se observa como -  
los títulos alcanzados por los animales sobrevi -  
vientes fueron siempre superiores a los que mu -  
rieron. Del mismo modo, en la gráfica III.9. se  
representan los valores blásticos medios induci -  
dos por PHA, PWM y LPS en ambos grupos de anima -  
les, tanto en condiciones fisiológicas como tras  
la primera semana post infección. Se observa co -  
mo ambos grupos de animales presentaban valores  
muy semejantes antes de la inoculación para los  
diferentes mitógenos. Por el contrario, los va -  
lores obtenidos en la primera semana PI presen -  
taban una muy significativa disminución en el -  
grupo de animales que murieron en comparación -  
con los sobrevivientes gráfica (III.9 ).

III.A.5. Valoración de la capacidad fagocítica.

Ante la gran importancia que los mecanismos fago -  
cíticos tienen en las enfermedades infecciosas y  
a la existencia de animales portadores de PPA, -

GRAFICA III-9



Valoración funcional de los linfocitos T y B en los cerdos inoculados con el virus España 75.

se estudió la capacidad fagocítica de los Monocitos-Macrófagos y de los polimorfonucleares neutrófilos en todos los cerdos antes y después de la inoculación.

III.A.5.1. Estudios del Monocito-Macrófago y del polimorfonuclear neutrófilo.

La capacidad fagocítica de estas células se valoró mediante la monitorización de la ingestión de partículas de Latex y Zymosan, observándose a través de la microscopia ordinaria el número de partículas ingeridas. También se cuantificaron la Fosfatasa Ácida liberada por los M-M tras la ingestión de las partículas ya mencionadas.

En la tabla III-5 se representan los valores medios de estos dos parámetros a lo largo de toda la experiencia. Es de destacar el casi perfecto paralelismo de ambos parámetros que demuestran una disminución de la capacidad fagocítica de estas células a partir de II, III y IV semana, observándose hacia la IV y, sobre todo en la quinta, la casi recuperación de los valores. En contraste a estos resultados obtenidos en los M-M, ningún tipo de alteración fue observado ni en la capacidad fagocítica ni en la liberación enzimática en los polimorfonucleares (PMN). Tabla III-5.

T A B L A III-5

VALORACION DE LA CAPACIDAD FAGOCITICA EN LOS ANIMALES INOCULADOS CON EL VIRUS ESPAÑA 75.

## MONOCITO-MACROFAGO (M-M)

SEMANAS	LATEX	FOSFATASA ACIDA
0	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 20
I	98 $\pm$ 10	96 $\pm$ 10
II	94 $\pm$ 0,9	94 $\pm$ 12
III	47 $\pm$ 10	48 $\pm$ 10
IV	41 $\pm$ 0,8	41 $\pm$ 0,9
V	70 $\pm$ 10	74 $\pm$ 10

## POLIMORFONUCLEAR NEUTROFILO(PMN)

SEMANAS	LATEX	FOSFATASA ACIDA
0	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 10
I	98 $\pm$ 10	99 $\pm$ 10
II	100 $\pm$ 10	97 $\pm$ 10
III	97 $\pm$ 0,9	96 $\pm$ 10
IV	98 $\pm$ 0,8	99 $\pm$ 0,9
V	100 $\pm$ 0,9	96 $\pm$ 0,8

RESULTADOS EXPRESADOS EN PORCENTAJE DE LOS VALORES REALES.

Es también importante destacar que a pesar de realizarse repetidas experiencias para poner de manifiesto la presencia de  $\beta$  glucoridasa no se observó ninguna cantidad significativa de la mencionada enzima.

#### III.A.6. Valoración del Complemento.

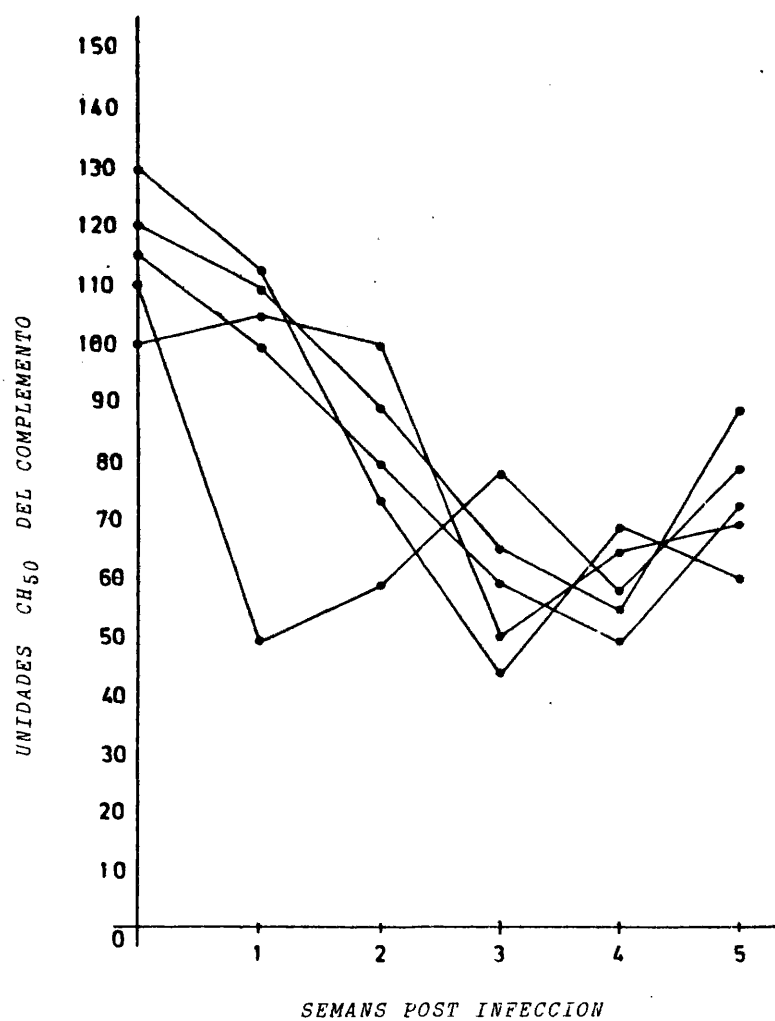
Los valores basales fueron determinados en todos los animales en tres ocasiones antes de la inoculación. Estos valores resultaron de 100 a 150 unidades/mililitro de  $\text{CH}_{50}$ . A lo largo de la experiencia se observó una disminución significativa de los valores, siendo en la III y IV semana cuando aparecían más bajos (gráfica III-10.). Hacia la V. semana PI, los valores tendían hacia la normalidad aunque todavía los valores estaban por debajo de los basales.

Es interesante destacar que en los animales sacrificados "in extremis" durante la primera semana PI, los valores de la actividad hemolítica fueron muy bajos (30 a 60  $\text{CH}_{50}$ ) en comparación con los basales.

#### III.A.7. Cuantificación del Factor de activación de las plaquetas.

Se estudió la liberación de PAF mediante la reacción del antígeno específico (VPPA) con sangre periférica de los diferentes animales, mediante la reacción mediada por IgE y basófilos, siguiendo la técnica descrita por Benveniste et al, -- (1974).

GRAFICA III-10



*Cambios secuenciales de la concentración de complemento en cinco cerdos inoculados con el virus España 75.*



Solamente en los cerdos que sobrevivieron a la infección la primera y segunda semana PI, se observaron valores de liberación de PAF significativos. En la gráfica III-10. se puede observar como los valores de PAF durante la primera semana eran semejantes a los controles; en la segunda semana se liberaba un 25% de serotonina-tritiada, siendo a la tercera semana cuando se obtenían los valores más altos (45%), manteniéndose prácticamente constantes en la cuarta semana (43%) para descender ligeramente hacia la quinta y última semana de la experiencia (40%).

Es importante resaltar que la liberación de serotonina-tritiada inducida por el antígeno de PPA es significativamente más alta que la inducida con el antígeno control (*Ascaris suis*) que es un gran estimulador de la síntesis de IgE. Gráfica III.12.

#### III.A.8. Estudios inmunohistológicos

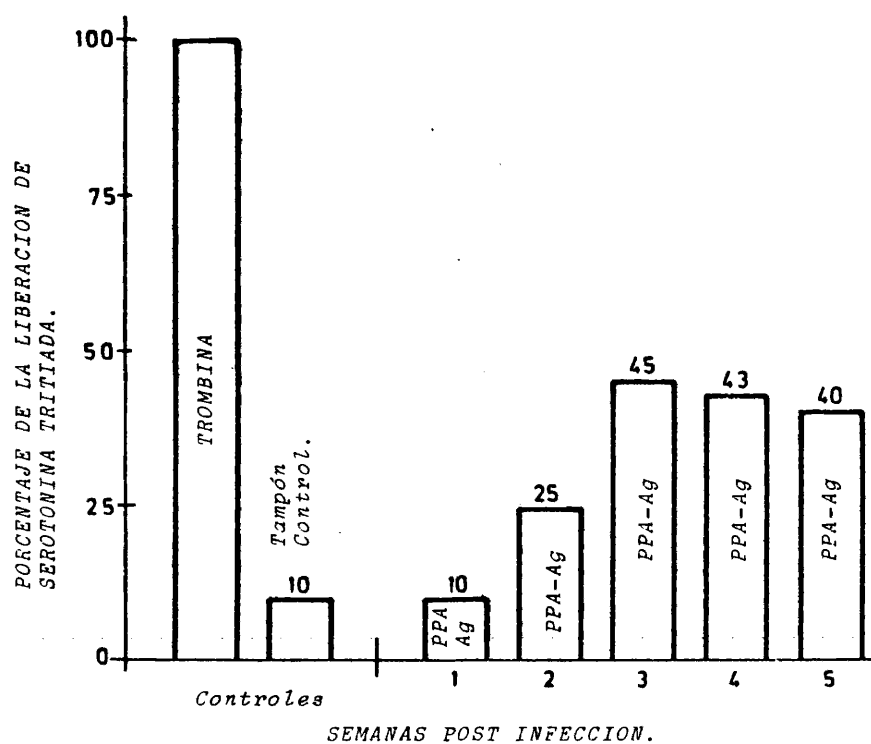
Los estudios realizados para la puesta en evidencia de depósitos de inmunocomplejos inducidos por el VPPA, solo se pudieron llevar a cabo en cinco de los quince cerdos inoculados en este grupo.

El glomérulo de estos animales presentó fluorescencia positiva al VPPA,  $C_3$ , e IgG a partir de la tercera semana PI.

En todos los cortes realizados se efectuó la técnica de bloqueo para poder comprobar la especificidad de los inmunocomplejos.

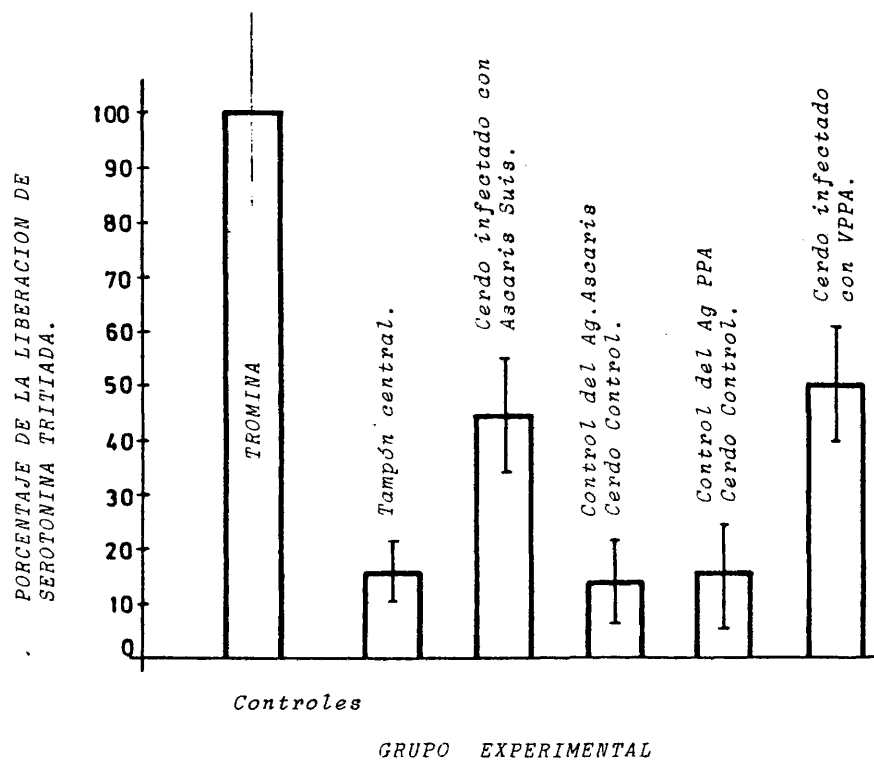
Generalmente, en los patrones observados para depósitos de IgG, ésta ocupaba tanto la zona de la

GRAFICA III-11



Liberación secuencial de PAF a lo largo de la infección de PPA en los cerdos inoculados con el virus España 75.

GRAFICA III-12



Valores comparativos de la liberación de PAF en cerdos inoculados con el virus de la PPA España 75, cerdos inoculados con *Ascaris Suis.*

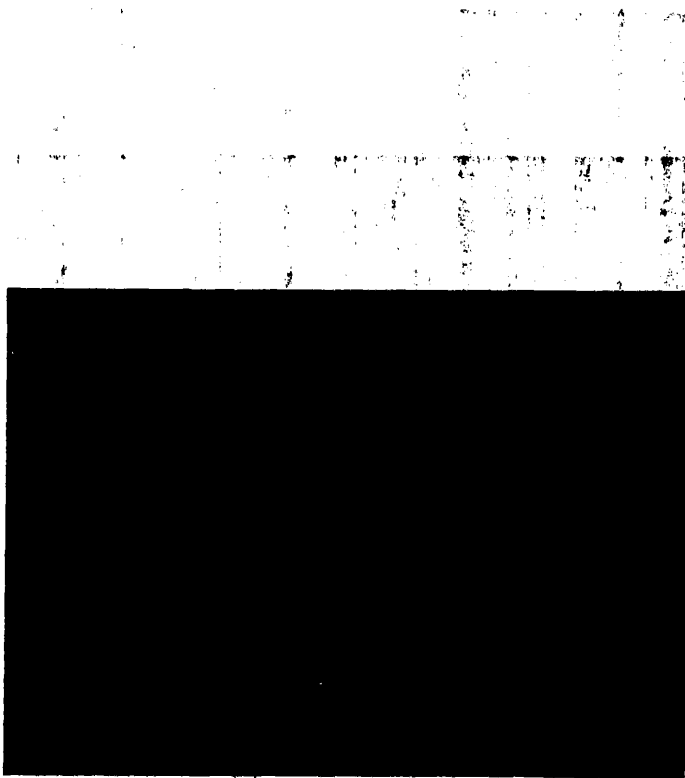
membrana basal como la mesangial, mientras que los depósitos de  $C_3$  aparecían más en la zona mesangial que en la membrana basal (foto III-3). La tinción con el anti VPPA presentó un patrón más similar al de  $C_3$  que al de IgG (foto III-4).

Es importante destacar el paralelismo entre el aumento de liberación de PAF y la observación de Inmunocomplejos de depósito (gráfica III-11).

#### III.A 9. Anatomía patológica

En los animales que murieron durante las dos primeras semanas PI se observaron lesiones típicas de PPA aguda, clasificadas por Sánchez Botija (1965) como tipo I.

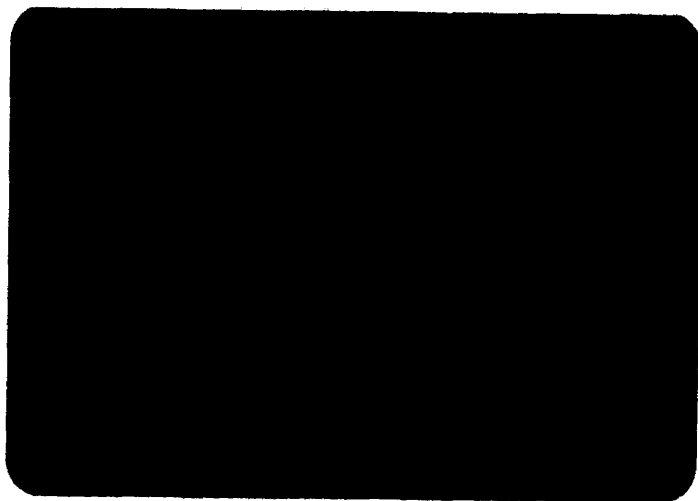
En los cerdos que fueron sacrificados al final de la experiencia (V semana) no se observaron lesiones significativas de PPA a nivel macroscópico, a excepción de uno de ellos que presentaba una ligera congestión y hemorragia en el ganglio mesentérico.

**FOTOGRAFIA III-3**  
=====

*Depósitos en forma granular distribuidos irregularmente ocupando los vasos capilares, del glomérulo y región mesangial. Obsérvese la - falta de depósitos en la arteriola.*

*Teñido con un suero de conejo, marcado con fluoresceína , anti IgG de cerdo..*

FOTOGRAFIA III-4



*Depósitos de C<sub>3</sub> distribuidos principalmente en la zona mesangial. Imágenes semejantes se obtuvieron utilizando un suero anti VPPA. Teñido con un suero de conejo, marcado con fluoresceína, anti la fracción C<sub>3</sub> del Complemento de cerdo.*

### III.B. ANIMALES ADULTOS INOCULADOS CON LOS VIRUS DE REPUBLICA - DOMINICANA, BRASIL, LISBOA 60 Y ESPAÑA 79.

Dadas las enormes diferencias clínicas y anatomopatológicas entre los cerdos adultos inoculados con VPPA de alta virulencia y aquellos que lo son con virus de baja virulencia, pensamos que quizás fuera de interés estudiar la respuesta inmune en estos animales frente a virus de las dos características mencionadas, con el fin de valorar sus posibles diferencias inmunológicas, así como observar la repetibilidad ó no de algunos fenómenos observados en los animales inoculados con el virus España 75 parcialmente atenuado.

#### III.B.1. Estudio de la infección

Los veinticinco animales adultos utilizados en estos experimentos fueron divididos en grupos de cinco, siendo cada uno de ellos inoculados con los virus República Dominicana, Brasil, Lisboa 60 y España 79, dejando un grupo de 5 cerdos como controles.

Los dos grupos inoculados con el virus de la República Dominicana y Brasil sobrevivieron durante toda la experiencia (20 días). Por el contrario, los inoculados con Lisboa 60 y España 79 murieron entre el 7º y 9º día post-infección (Tabla III-6.).

#### III.B.2. Determinación de viremia y anticuerpos específicos

En todos los animales de este grupo se observó viremia desde el día cuatro (primeras muestras) hasta el final de los estudios (Tabla III.7.)

En los cerdos inoculados con República Dominicana y Brasil se detectó IgM al 4º día PI mediante ELISA, con títulos que oscilaron entre 1/16 y

T A B L A   I I I   -   6

ESTUDIO DE LA INFECCION EN CERDOS ADULTOS  
INFECTADOS CON VARIOS VPPA.

Nº CERDO	VIRUS	MS	DPI
101	RD	S	20
102	RD	S	20
106	RD	S	20
108	RD	S	20
109	RD	S	20
103	BRASIL	S	20
104	BRASIL	S	20
105	BRASIL	S	20
107	BRASIL	S	20
108	BRASIL	S	20
1293	LISBOA 60	M	9
1294	LISBOA 60	M	7
1295	LISBOA 60	M	9
1296	LISBOA 60	M	7
1297	LISBOA 60	M	7
1306	ESPAÑA 79	M	9
1307	ESPAÑA 79	M	9
1308	ESPAÑA 79	SI	9
1309	ESPAÑA 79	SI	9
1310	ESPAÑA 79	M	9

M = MUERTO

S = SACRIFICADO

SI = SACRIFICADO "IN EXTREMIS"

RD = REPUBLICA DOMINICANA



T A B L A   I I I - 7

=====

RESULTADOS DE VIREMIA Y ANTICUERPOS

D I A	VIRUS	VIREMIA	ANTICUERPOS ELISA
0	RD	NEG.	NEG.
4	RD	POS.	IGM
8	RD	Pos.	IGM-IGG
12	RD	Pos.	IGM-IGG
16	RD	Pos.	IGG
20	RD	Pos.	IGG
0	BR	NEG.	NEG.
4	BR	Pos.	IGM
8	BR	Pos.	IGM-IGG
12	BR	Pos.	IGM-IGG
16	BR	Pos.	IGG
20	BR	Pos.	IGG
0	LIS 60	NEG.	NEG.
4	LIS 60	POS.	NEG.
7	LIS 60	POS.	IGG
9	LIS 60	POS.	IGG
0	ESPAÑA 79	NEG.	NEG.
4	ESPAÑA 79	POS.	NEG.
7	ESPAÑA 79	POS.	IGG
9	ESPAÑA 79	POS.	IGG

RD      REPUBLICA DOMINICANA

1/32, encontrándose a los 8 días PI niveles de IgM e IgG (Tabla III-7.). Los títulos de IgG se mantuvieron hasta el 20 día PI. Por el contrario, en los cerdos inoculados con Lisboa 60 y España 79 no se observaron cantidades detectables de IgM, ni al 4º ni al 7º día PI. Tampoco los niveles de IgG específica fueron detectados hasta el 7º día PI. Los títulos fueron inferiores a los de los cerdos inoculados con República Dominicana y Brasil.

### III.B.3. Cuantificación de Leucocitos totales y Linfocitos formadores de roseta.

Los leucocitos totales y los linfocitos (FR) fueron valorados, en todos los animales de este grupo, cada cuatro días después de la inoculación.

En la primera determinación PI (4 días), los valores de los leucocitos totales fueron muy semejantes en los cinco grupos. A los 7 y 8 días PI, se observaba una inflexión en los valores con relación a los controles y a las cifras basales de todos los cerdos inoculados, siendo ésta disminución más significativa en los inoculados con Lis. 60 y Esp. 79 que en los inoculados con RD y Br (Tabla III-8.).

A los 12 DPI, los animales inoculados con RD y Br, sobrevivientes a la infección, presentaban valores de  $51 \pm 3.2$  y  $60 \pm 1.5$  respectivamente. A partir de este punto, los leucocitos totales fueron ascendiendo progresivamente, encontrándose, a los 20 DPI, valores casi iguales a los controles ( $92 \pm 7.1$  para RD y  $88 \pm 2.1$  en los inoculados).

T A B L A   I I I   -   8  
=====

CUANTIFICACION DE LOS LEUCOCITOS  
TOTALES Y CELULAS CFR.

D I A	VIRUS	LEUCOCITOS TOTALES	C F R
0	RD	100 ± 10	100 ± 12
4	RD	72 ± 5,2	50 ± 5,1
8	RD	52 ± 2,1	60 ± 6,1
12	RD	51 ± 3,2	86 ± 6,3
16	RD	68 ± 3,4	99 ± 10
20	RD	92 ± 7,1	100 ± 10
0	BRASIL	100 ± 9,5	100 ± 1,5
4	BRASIL	70 ± 4,6	100 ± 10
8	BRASIL	68 ± 2,7	48 ± 5,3
12	BRASIL	60 ± 1,5	58 ± 6,1
16	BRASIL	64 ± 3,1	75 ± 6,2
20	BRASIL	88 ± 2,1	100 ± 12
0	LISBOA 60	100 ± 10	100 ± 15
4	LISBOA 60	60 ± 5,2	50 ± 8,1
7	LISBOA 60	44 ± 4,3	45 ± 10
9	LISBOA 60	47 ± 2,1	50 ± 10
0	ESPAÑA 79	100 ± 10	100 ± 20
4	ESPAÑA 79	70 ± 7,1	60 ± 10
7	ESPAÑA 79	45 ± 10	35 ± 15
9	ESPAÑA 79	40 ± 13	22 ± 10

RD    REPUBLICA DOMINICANA

Por otra parte, los linfocitos (FR) presenta - ron valores casi paralelos a los obtenidos en la cuantificación de los leucocitos totales (Tabla III 8). También en esta determinación los puntos de inflexión fueron más acusados en los animales inoculados con Lis 60 y Esp 79, principalmente estos últimos, que aquellos inoculados con RD y Br.

#### III.B.4. Respuesta funcional "in vitro" de los linfocitos frente a mitógenos y al antígeno.

La inducción blástica específica (Ag PPA) e inespecífica (PHA, PWM y LPS) fué evaluada cada cuatro días en los cinco grupos de este experimento.

En la tabla III-9 se representan los valores obtenidos en los grupos inoculados con RD, Br, Lis 60 y Esp 79, al igual que los controles frente a los diferentes mitógenos.

El comportamiento funcional de los cuatro grupos inoculados fue semejante a lo observado en otros parámetros ya evaluados, pudiéndose diferenciar dos grupos; por un lado los cerdos inoculados con RD y Br presentaban valores muy semejantes entre ellos, en los que cabe destacar una significativa disminución de la blastogénesis inducida por PHA y PWM, especialmente a los 8 DPI, con valores para PHA de  $58 \pm 7$  en los inoculados con RD y de  $59 \pm 10$  para los que lo fueron con Br. De igual forma, en el caso del PWM los valores fueron de  $76 \pm 10$  y  $83 \pm 10$  respectivamente. A los 16 ó 20 días PI, se volvían a recuperar en ambos grupos de animales los índices basales. por el contrario, no se observó ningún cambio significativo en la inducción blástica con LPS, siendo los valores en ambos grupos de animales muy semejantes a

T A B L A III - 9

INDUCCION BLASTICA ESPECIFICA  
E INESPECIFICA EN CERDO.

ADULTOS INOCULADOS CON DIFERENTES VPPA.

DIA	VIRUS	PHA	PWM	LPS	PPA-Ag
0	RD	100 ± 10	100 ± 12	100 ± 20	0,10 ± 0,10
4	RD	70 ± 10	90 ± 12	90 ± 15	0,15 ± 0,20
8	RD	58 ± 7	76 ± 10	91 ± 10	0,10 ± 0,10
12	RD	91 ± 10	83 ± 7	88 ± 10	0,80 ± 0,20
16	RD	97 ± 8	77 ± 10	90 ± 10	1,50 ± 0,40
20	RD	96 ± 10	80 ± 8,6	94 ± 15	4,54 ± 0,50
0	BRASIL	100 ± 8	100 ± 10	100 ± 12	0,10 ± 0,06
4	BRASIL	91 ± 9	72 ± 9	95 ± 7	0,10 ± 0,08
8	BRASIL	59 ± 10	83 ± 10	96 ± 6	0,36 ± 0,10
12	BRASIL	90 ± 7	72 ± 7	91 ± 10	1,00 ± 0,20
16	BRASIL	100 ± 12	88 ± 10	94 ± 6	1,45 ± 0,40
20	BRASIL	100 ± 15	100 ± 9	96 ± 5	5,10 ± 0,60
0	LISBOA 60	100 ± 15	100 ± 10	100 ± 10	0,15 ± 0,10
4	LISBOA 60	59 ± 7	93 ± 4	90 ± 5	0,10 ± 0,05
7	LISBOA 60	50 ± 5	65 ± 7	92 ± 4	0,12 ± 0,10
9	LISBOA 60	44 ± 8	56 ± 9	91 ± 10	0,15 ± 0,12
0	ESPAÑA 79	100 ± 10	100 ± 20	100 ± 15	0,11 ± 0,5
4	ESPAÑA 79	40 ± 10	60 ± 10	90 ± 5	0,15 ± 0,10
7	ESPAÑA 79	32 ± 7	40 ± 10	92 ± 10	0,12 ± 0,10
9	ESPAÑA 79	40 ± 10	30 ± 7	91 ± 10	0,11 ± 0,10
0	CONTROLES	100 ± 10	100 ± 10	100 ± 15	0,10 ± 0,10
4	CONTROLES	80 ± 15	100 ± 15	100 ± 13	0,15 ± 0,08
8	CONTROLES	100 ± 12	80 ± 10	90 ± 10	0,10 ± 0,12
12	CONTROLES	90 ± 15	90 ± 12	94 ± 15	0,12 ± 0,09
16	CONTROLES	95 ± 10	100 ± 15	89 ± 10	0,10 ± 0,10

los de los animales cōntrol.

Al igual que para los mitógenos, se observó un gran paralelismo entre estos dos grupos de animales, en los índices blásticos obtenidos con el antígeno específico. Los valores de estos animales fueron comunes a los otros tres grupos hasta los 8 DPI. A los 12 DPI, los índices blásticos fueron en aumento progresivo frente a los controles, presentando a los 16 DPI unos índices blásticos de  $1,50 \pm 0,40$  para RD y  $1,45 \pm 0,40$  para Br. A los 20 DPI el aumento en los índices blásticos era muy significativo, presentando valores de  $4,54 \pm 0,50$  y  $5,10 \pm 0,60$  respectivamente (Tabla III-9).

por otro lado, los cerdos inoculados con los virus Lis 60 y Esp 79 presentaron una inmunosupresión significativa, tanto frente a los mitógenos (PHA y PWM) como frente al antígeno específico. Sin embargo, presentaron valores normales para el LPS. Así los animales inoculados con Esp 79 presentaron a los 7 DPI unos valores de  $32 \pm 7$  para PHA,  $40 \pm 10$  para PWM y  $0,12$  frente al antígeno, siendo de  $92 \pm 10$  para el LPS. De igual forma, los inoculados con Lis 60 presentaron valores muy semejantes, aunque ligeramente superiores. Para PHA los valores fueron, a los 7 DPI de  $50 \pm 5$ , siendo para PWM y Antígeno PPA de  $65 \pm 7$  y  $0,12 \pm 0,10$  respectivamente. También en este caso el LPS no indujo inmunosupresión (LPS =  $92 \pm 4$ ). (Tabla III-9).

### III.B.5. Diferencias en la respuesta funcional de los linfocitos frente a peste porcina Africana y peste porcina Clásica.

Con el fin de comprobar si las variaciones observadas en la respuesta funcional de los linfocitos era específica del VPPA o si, por el contrario, podía ser común a otras infecciones víricas, se compararon los resultados obtenidos en la inducción blástica con PHA y LPS de los grupos de cerdos adultos inoculados con RD, Br y Lis 60 con los obtenidos en los cerdos inoculados con el virus de la peste porcina clásica. Las siguientes diferencias fueron observadas. Los animales infectados con el virus de la PPC presentaron una disminución moderada con PHA y PWM, mientras que aparecía una marcada disminución de los índices blásticos frente a LPS. En contraste, los cerdos infectados con los virus de la PPA presentaron una depresión más marcada en PHA y PWM y unos índices normales en LPS. (Tabla III-10).

Es también importante destacar que el virus de la peste porcina clásica se comportó como los virus de la PPA de alta virulencia en cuanto a la mortalidad, así, en ambos grupos, se produjo la muerte a los 16 DPI (Tabla III.10).

#### III.B.6. Valoración de la capacidad fagocítica de los monocitos y polimorfonucleares.

La capacidad fagocítica de los M-M y de los PMN de este grupo fue también valorada mediante la ingestión de partículas de Latex y la liberación enzimática de la Fosfatasa Ácida (Tabla III-15 y III-16).

En la tabla III-15 se representan los valores porcentuales medios de la capacidad fagocí-

T A B L A III - 10

DIFERENCIAS EN LA RESPUESTA FUNCIONAL DE LOS  
LINFOCITOS FRENTE A PESTE PORCINA AFRICANA  
CLASICA.

D I A	P H A			
	PPA Rd	PPA BR	PPA Lis 60	PPC
0	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 8	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 12
4	70 $\pm$ 10	91 $\pm$ 9	90 $\pm$ 5	97 $\pm$ 10
8	58 $\pm$	59 $\pm$ 10	92 $\pm$ 4	92 $\pm$ 5
12	91 $\pm$ 10	90 $\pm$ 7	91 $\pm$ 10	87 $\pm$ 10
16	97 $\pm$ 8	100 $\pm$ 12	M	M
20	96 $\pm$ 10	100 $\pm$ 15	M	M

D I A	L P S			
	PPA Rd	PPA BR	PPA Lis 60	PPC
0	100 $\pm$ 20	100 $\pm$ 12	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 20
4	90 $\pm$ 15	95 $\pm$ 7	90 $\pm$ 5	65 $\pm$ 10
8	91 $\pm$ 10	96 $\pm$ 6	92 $\pm$ 4	50 $\pm$ 5
12	88 $\pm$ 10	91 $\pm$ 10	91 $\pm$ 10	43 $\pm$ 5



(Contin.) T A B L A III - 10  
=====

D I A	L P S			
	PPA RD	PPA BR	PPA Lis 60	PPC
16	90 $\pm$ 10	94 $\pm$ 6	M	M
20	94 $\pm$ 15	96 $\pm$ 5	M	M

VALORES PORCENTUALES MEDIOS OBTENIDOS DE LOS  
REALES.

M = MUERTE  
PPA = PESTE PORCINA AFRICANA  
PPC = PESTE PORCINA CLASICA  
RD = REPUBLICA DOMINICANA  
BR = BRASIL  
LIS 60 = LISBOA 60

T A B L A III - 15

CAPACIDAD FAGOCITICA DE LOS MONOCITOS-MACROFAGOS  
EN LOS CERDOS ADULTOS INOCULADOS CON VARIOS VPPA.

DIA	VIRUS	LATEX	FOSFATASA ACIDA
0	RD	100 ± 9,7	100 ± 5,4
4	RD	82 ± 7,9	99 ± 6,3
8	RD	62 ± 5,2	86 ± 9,1
12	RD	71 ± 3,1	70 ± 7,1
16	RD	78 ± 5,1	99 ± 10
20	RD	81 ± 6,1	97 ± 9,2
0	BRASIL	100 ± 10,2	100 ± 7,9
4	BRASIL	70 ± 5,9	100 ± 10
8	BRASIL	65 ± 2,9	69 ± 7,1
12	BRASIL	79 ± 3,7	68 ± 8,1
16	BRASIL	80 ± 3,1	75 ± 2,1
20	BRASIL	88 ± 2,9	90 ± 2,0
0	LISBOA 60	100 ± 9,3	100 ± 5,2
4	LISBOA 60	60 ± 5,1	75 ± 3,1
7	LISBOA 60	41 ± 3,1	58 ± 7,1
9	LISBOA 60	39 ± 2,1	41 ± 2,1
0	ESPAÑA 79	100 ± 10	100 ± 7,1
4	ESPAÑA 79	70 ± 5,1	60 ± 8,1
7	ESPAÑA 79	62 ± 7,1	45 ± 10
9	ESPAÑA 79	40 ± 3,1	28 ± 7,9

tica de los M-M. Se observa una disminución de los valores, en ambos parámetros, entre el 4 y 8 DPI. Siendo más acusado este descenso en los cerdos inoculados con Lis 60 y Esp 79 que en aquellos que lo fueron con RD y Br.

Los animales inoculados con los virus RD y Br presentaron una elevación progresiva de los valores a partir de los 12 DPI, siendo para la ingestión de Latex de  $81 \pm 6,1$  y  $88 \pm 2,9$  respectivamente y para la liberación enzimática de  $97 \pm 9,2$  y  $90 \pm 2,1$  a los 20 DPI.

Es importante destacar el gran paralelismo entre los valores obtenidos en el estudio de la ingestión de partículas como en la liberación enzimática, similitud existente en todos los casos.

Los resultados de la valoración de la capacidad fagocítica de los PMN presentaron una gran uniformidad en todas las muestras tomadas, uniformidad que correspondía con los valores de los animales controles así como de los valores basales (tabla III-16), siendo, no obstante, ligeramente inferiores los valores obtenidos en los cerdos inoculados con Lis 60 y Esp 79.

#### III.B.7. Anatomía patológica

Las lesiones macroscópicas observadas en los cerdos inoculados con los virus Lis 60 y Esp 79 fueron muy similares a las descritas como lesiones clásicas de la Peste Porcina Africana (Sánchez Botija et al (1965) : ganglios linfáticos gastrohepáticos, renal y mandibular hemorrági -

T A B L A III - 16

CAPACIDAD FAGOCITICA DE LOS PMN EN LOS  
CERDOS ADULTOS INOCULADOS CON VARIOS VPPA.

DIA	VIRUS	LATEX	FOSFATASA ACIDA
0	RD	100 ± 9,1	100 ± 4,2
4	RD	97 ± 0,2	99 ± 0,2
8	RD	99 ± 0,8	98 ± 0,7
12	RD	98 ± 0,9	98 ± 0,3
16	RD	96 ± 0,7	99 ± 0,4
20	RD	99 ± 0,7	98 ± 0,7
0	BRASIL	100 ± 10	100 ± 9,2
4	BRASIL	95 ± 0,5	99 ± 0,4
8	BRASIL	98 ± 0,2	97 ± 0,3
12	BRASIL	97 ± 0,2	99 ± 0,4
16	BRASIL	96 ± 0,7	92 ± 0,1
20	BRASIL	98 ± 0,1	97 ± 0,3
0	LISBOA 60	100 ± 7,3	100 ± 2,1
4	LISBOA 60	98 ± 0,2	99 ± 0,7
7	LISBOA 60	95 ± 0,7	96 ± 0,1
9	LISBOA 60	90 ± 0,3	95 ± 0,7
0	ESPAÑA 79	100 ± 6,8	100 ± 9,4
4	ESPAÑA 79	97 ± 0,3	99 ± 0,9
7	ESPAÑA 79	96 ± 0,2	94 ± 0,7
9	ESPAÑA 79	91 ± 0,4	93 ± 0,9

RD = REPUBLICA DOMINICANA

cos e hipertróficos, esplenomegália hemorrági  
ca, petequias hemorrágicas en riñón y edema  
pulmonar. por el contrario, las lesiones observa  
vadas en los animales inoculados con RD y Br  
eran poco severas, apareciendo ligera conges -  
tión, generalmente en el ganglio gastrohepáti-  
co, algunas petequias en riñón y una ligera zona  
na congestiva en pulmón.

### III.C. LECHONES INOCULADOS CON EL VIRUS DE LA REPUBLICA DOMINICANA, BRASIL, LISBOA 60 Y ESPAÑA 79.

Para realizar estos estudios se utilizaron lechones obtenidos por cesárea, los cuales no habían sido alimentados con ningún tipo de calostro. Se mantuvieron en ambiente estéril hasta cumplir los 15 días de edad, en que fueron divididos en grupos de cinco e inoculados con RD, Br, Lis 60 y Esp 79, dejando un grupo de control.

#### III.C.1. Estudio de la infección.

Los veinte animales murieron de PPA aguda entre el 4º y 9º día PI, independientemente del virus con el que fueron inoculados (Tabla III.11.).

#### III.C.2. Determinación de Viremia y Anticuerpos específicos.

En las tres muestras que pudieron ser analizadas en este grupo (4, 6, 9 DPI), todos los animales mostraron virus en sangre. Sin embargo, no se pudieron de manifiesto cantidades detectables, mediante nuestras técnicas, de anticuerpos específicos de PPA (Tabla III.12.)

#### III.C.3. Cuantificación de Leucocitos totales y Linfocitos formadores de Rosetas.

Los valores de leucocitos totales y linfocitos (FR) fueron prácticamente iguales en los cuatro grupos inoculados y presentaron una progresiva disminución, mostrando en el 9º DPI valores de leucocitos totales y linfocitos (FR) de  $36 \pm 5$  y  $70 \pm 13$  respectivamente en los inoculados con RD,  $45 \pm 3$  y  $60 \pm 10$  en Br,  $40 \pm 10$  y  $40 \pm 5$  en Esp.79 y finalmente valores de  $40 \pm 5$  y  $64 \pm 10$  para los inoculados con Lis 60 (Tabla III.13.).

T A B L A III - 11

=====

ESTUDIO DE LA INFECCION EN LOS LECHONES  
INOCULADOS CON VARIOS VPPA.

Nº ANIMAL	VIRUS	V, M, SI	D P I
1	RD	ST	6
2	RD	M	9
3	RD	M	6
5	RD	M	6
6	RD	M	9
18	BRASIL	M	6
19	BRASIL	M	5
20	BRASIL	SI	6
21	BRASIL	M	9
22	BRASIL	M	4
23	LISBOA 60	M	9
24	LISBOA 60	M	6
25	LISBOA 60	M	5
26	LISBOA 60	M	4
11	ESPAÑA 79	M	5
12	ESPAÑA 79	M	5
13	ESPAÑA 79	M	6
14	ESPAÑA 79	M	6
15	ESPAÑA 79	M	4
4	CONTROL	V	-
7	CONTROL	V	-
8	CONTROL	V	-
10	CONTROL	V	-
17	CONTROL	V	-

V = VIVO - SI = SACRIFICADO "IN EXTREMIS"  
M = MUERTO - RD = REPUBLICA DOMINICANA.

T A B L A III - 12

ESTUDIO DE VIREMIA Y ANTICUERPOS ESPECIFICOS EN LOS LECHONES INOCULADOS CON VARIOS VPPA.

D I A	VIRUS	VIREMIA	ANTICUERPOS
0	RD	NEG.	NEG.
4	RD	Pos.	NEG.
6	RD	Pos.	NEG.
9	RD	Pos.	NEG.
0	BRASIL	NEG.	NEG.
4	BRASIL	Pos.	NEG.
6	BRASIL	Pos.	NEG.
9	BRASIL	Pos.	NEG.
0	LISBOA 60	NEG.	NEG.
4	LISBOA 60	Pos.	NEG.
6	LISBOA 60	Pos.	NEG.
9	LISBOA 60	Pos.	NEG.
0	ESPAÑA 79	NEG.	NEG.
4	ESPAÑA 79	Pos.	NEG.
6	ESPAÑA 79	Pos.	NEG.
9	ESPAÑA 79	Pos.	NEG.

Pos. = POSITIVO

NEG. = NEGATIVO

ANTICUERPOS VALORADOS MEDIANTE ELISA INDIRECTO UTILIZANDO IGG DE CONEJO ANTI IGM DE CERDO.

RD = REPUBLICA DOMINICANA



T A B L A III - 13

=====

CUANTIFICACION DE LOS LEUCOCITOS TOTALES  
Y LOS LINFOCITOS (FR) EN LOS LECHONES -  
INOCULADOS CON VARIOS VPPA.

D I A	VIRUS	LEUCOCITOS	LINFOCITOS (FR)
0	RD	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 15
4	RD	60 $\pm$ 8,1	80 $\pm$ 10
6	RD	40 $\pm$ 5,1	69 $\pm$ 10
9	RD	36 $\pm$ 5,2	70 $\pm$ 13
0	BRASIL	100 $\pm$ 20	100 $\pm$ 10
4	BRASIL	70 $\pm$ 10	75 $\pm$ 20
6	BRASIL	55 $\pm$ 10	65 $\pm$ 15
9	BRASIL	45 $\pm$ 3,7	60 $\pm$ 10
0	LISBOA 60	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 15
4	LISBOA 60	60 $\pm$ 15	80 $\pm$ 15
6	LISBOA 60	50 $\pm$ 20	75 $\pm$ 20
9	LISBOA 60	40 $\pm$ 10	64 $\pm$ 20
0	ESPAÑA 79	100 $\pm$ 20	100 $\pm$ 10
4	ESPAÑA 79	75 $\pm$ 10	60 $\pm$ 20
6	ESPAÑA 79	64 $\pm$ 13	45 $\pm$ 20
9	ESPAÑA 79	40 $\pm$ 10	40 $\pm$ 5

FR = FORMADORES DE ROSETA

RD = REPUBLICA DOMINICANA

#### III.C.4. Respuesta funcional "in vitro" de los Linfocitos frente a mitógenos y antígeno.

La inducción blástica inespecífica (PHA, PWM y LPS) y específica (Ag PPA) fué evaluada antes de la inoculación (día 0) y, posteriormente, los días 4, 6 y 9, en todos los animales de este grupo de estudio.

En la tabla III.14. se expresan los valores porcentuales medios obtenidos en cada grupo de lechones. En todos ellos apareció una disminución muy significativa de la respuesta frente a PHA y PWM, siendo ligeramente menos acusada la disminución frente a LPS. No existieron prácticamente diferencias entre los inoculados con RD y Br y los inoculados con Lis.60 y Esp.79, al igual que ocurría en los cerdos adultos.

En el caso de la inducción blástica específica con el antígeno de la PPA, tampoco se observó ningún tipo de estimulación (Tabla III.14.).

#### III.C.5. Anatomía Patológica.

En el examen anatomopatológico efectuado en todos los animales muertos entre los días 4, 6 y 9 DPI, (Tabla III.11 ), se observaron lesiones macroscópicas típicas de Peste Porcina Africana, tal como fueron clasificadas por Sánchez Botija et al, (1965). Las lesiones no presentaron ningún tipo de diferencias según los distintos virus inoculados.

T A B L A III - 14

INDUCCION BLASTICA ESPECIFICA E INESPECIFICA  
EN LECHONES INOCULADOS CON VARIOS VPPA.

DIA	VIRUS	PHA	PWM	LPS	AG-PPA
0	RD	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 15	NEG.
4	RD	50 $\pm$ 10	43 $\pm$ 20	60 $\pm$ 15	NEG.
6	RD	40 $\pm$ 10	49 $\pm$ 15	53 $\pm$ 20	NEG.
9	RD	45 $\pm$ 5	33 $\pm$ 10	41 $\pm$ 10	NEG.
0	BRASIL	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 20	100 $\pm$ 10	NEG.
4	BRASIL	80 $\pm$ 20	65 $\pm$ 10	82 $\pm$ 10	NEG.
6	BRASIL	60 $\pm$ 20	70 $\pm$ 13	73 $\pm$ 15	NEG.
9	BRASIL	70 $\pm$ 15	63 $\pm$ 10	78 $\pm$ 10	NEG.
0	LISBOA 60	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 10	NEG.
4	LISBOA 60	60 $\pm$ 20	43 $\pm$ 10	70 $\pm$ 5	NEG.
6	LISBOA 60	50 $\pm$ 10	50 $\pm$ 5	78 $\pm$ 10	NEG.
9	LISBOA 60	45 $\pm$ 5	45 $\pm$ 5	65 $\pm$ 15	NEG.
0	ESPAÑA 79	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 10	100 $\pm$ 5	NEG.
4	ESPAÑA 79	89 $\pm$ 10	60 $\pm$ 3	73 $\pm$ 15	NEG.
6	ESPAÑA 79	60 $\pm$ 5	50 $\pm$ 5	69 $\pm$ 5	NEG.
9	ESPAÑA 79	60 $\pm$ 5	55 $\pm$ 5	59 $\pm$ 10	NEG.

RD = REPUBLICA DOMINICANA

### III.D. EFFECTOS DEL VIRUS DE LA PPA SOBRE LAS PRINCIPALES CELULAS DEL SISTEMA INMUNE.

Como se ha puesto de manifiesto en los apartados III.A.3, III.B.4 y III.C.4 la infección con el virus de la PPA produce una supresión significativa en la capacidad funcional de la respuesta de los linfocitos T frente a mitógenos, siendo esta inmunosupresión más acusada en la infección por virus de alta virulencia que en los de baja.

por otra parte en los apartados III.A.5 y III.B.6 también se ha podido observar que la capacidad fagocítica de los M-M se encontraba alterada "in vitro" en los cerdos infectados con diferentes VPPA.

A diferencia con lo anteriormente expuesto la capacidad funcional de los linfocitos B y de los PMN parecía menos o nada alterada durante la infección experimental de PPA.

Con el fin de comprobar el posible paralelismo existente entre la respuesta funcional y la infección "in vitro" sobre cada una de las células del sistema inmune antes mencionadas se aislaron y purificaron poblaciones de linfocitos B, T, M-M y PMN infectándose con el VPPA. La infección fue evaluada a las 24, 48, 72 y 96 horas mediante la fluorescencia directa y la hemoadsorción.

En el cuadro inferior se resumen los resultados obtenidos:

	M - M	PMN	B (IS)	T (FR)
Fluorescencia				
Directa.	pos	Neg	Neg	Pos
Hemoadsorción	pos	Neg	Neg	Pos

Los M-M presentaron fluorescencia positiva al igual que replicación viral con el incremento de cuatro logaritmos. Por el contrario en los PMN y los linfocitos B no se observó fluorescencia ni replicación viral. En cuanto a los linfocitos T (FR) se observó fluorescencia positiva en todas las preparaciones así como replicación viral a partir de las 24 horas de infección "in vitro".

#### IV. DISCUSION

En este trabajo se han estudiado las variaciones inmunológicas de algunos de los parámetros más importantes de la respuesta inmunitaria durante la infección experimental con diferentes virus de PPA en cerdos adultos y lechones.

En los animales adultos, varios autores han observado la presencia simultánea de anticuerpos de la clase IgG y de virus en infecciones con diferentes cepas del virus de la PPA (De Boer et al, 1972, De Tray, 1957). Sin embargo, no se dispone de información relacionada con la cinética de la IgM específica de PPA en cerdos infectados con este virus. En este trabajo se ha podido demostrar la presencia de anticuerpos de la clase IgM a los cuatro días PI. Este fenómeno ha sido observado en el curso de la infección por dos de las cepas ensayadas, caracterizadas funcionalmente por su menor virulencia en cerdos adultos. En estos animales la presencia de IgM específica podría estar relacionada con la menor virulencia de esas cepas.

En el caso de los lechones fue observada también viremia durante toda la duración del experimento, aunque no se detectó IgM, siendo además, muy bajos los niveles de IgG. Probablemente esta conducta se debía a la gran virulencia de los diferentes vi-rus de PPA en estos animales.

Los virus considerados de baja virulencia para los cerdos adultos, inducen una respuesta humoral similar a la de las otras enfermedades víricas en cuanto a la cinética de aparición de IgM e IgG. Así, la IgM aparece a los cuatro días PI y desaparece a los doce días PI. La IgG aparece dentro de los patrones de otras infecciones víricas, pero ofrece diferencias características como es su mantenimiento durante todo el tiempo de persistencia de la infección de la PPA que, generalmente, se prolonga durante la vida del animal.

Las lesiones macroscópicas observadas en los cerdos adultos inoculados con los virus denominados de alta virulencia

(Lis 60 y Esp 79) coincidieron con las descritas por Maurer et al (1958), Sánchez Botija et al, (1965) y Moulton, J.E. and Coggins, L (1968). Igualmente, las lesiones observadas en los cerdos adultos con los virus de baja virulencia (RD y Br) coincidían con las observadas por Mebus et al, (1979 y 1981) en cerdos inoculados experimentalmente con los aislados procedentes de Brasil y República Dominicana. En cuanto a los lechones, las lesiones macroscópicas observadas, en todos los casos, eran independientes del virus inoculado y coincidían con las descritas por Sánchez Botija et al, (1965) como Tipo I. con mortalidad de 100%. Recientemente Mc Vicar et al., (1981). También han descrito lesiones semejantes en los lechones en el curso de la infección experimental con los virus procedentes de República Dominicana y Brasil. Por tanto, las diferencias del grado de virulencia entre los virus ensayados solamente ha podido ponerse de manifiesto en los cerdos adultos, ya que en los lechones todos los virus se comportaron como cepas de alta virulencia.

En los diferentes experimentos desarrollados en este trabajo se ha observado leucopenia con marcada linfopenia independiente del virus inoculado y de la edad del animal. Esta observación coincide con la descrita previamente por De Tray y Scott, GR, (1957) Wardley y Wilkinson, (1977 y 1980) en cerdos inoculados con otros virus diferentes a los utilizados en este trabajo, por lo que parece ser una constante en la infección con VPPA aunque no específica, pues resultados muy similares aparecen durante la infección experimental de PPC, De Tray, D y Scott, GR, (1957).

La linfopenia fue analizada mediante los receptores específicos de superficie. Las células T fueron caracterizadas por su afinidad para formar rosetas con los eritrocitos de carnero, de acuerdo con las observaciones de Escajadillo et al., (1975) utilizando la técnica de Buschaman et al, (1980) que trata los eritrocitos de carnero con neuroaminidasa. Las células B, valoradas por la presencia de inmunoglobulinas de superficie tal como fue

descrito por Pernis et al., (1977) y Buschmann et al., (1980). Paralelamente también fue utilizada la tinción específica de esterasas descrita por Lagotent et al, (1978) para la identificación de linfocitos T y B. Los resultados obtenidos con ésta última técnica fueron muy poco satisfactorios para la caracterización de éstas células en el cerdo, dada su falta de repetibilidad y pobre correlación con los receptores de superficie específicos.

Comparando los resultados obtenidos en la cuantificación de los linfocitos T y B mediante sus receptores de superficie se observó un gran paralelismo en los diferentes grupos de experimentos realizados. La linfopenia fué más acusada en los linfocitos T que en los B, estando la severidad de este fenómeno relacionada con la edad del animal y el virus inoculado. Así, en los lechones era más acusada que en los adultos, y en la infección con virus de alta virulencia era superior la linfopenia de células T que en los animales inoculados con virus de baja virulencia. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Wardley y Wilkinson (1980). Estos autores indican que observan una mayor linfopenia de las células B que de las T. La explicación a estas diferencias podría ser atribuida a las distintas condiciones de la técnica y de los virus utilizados por estos autores. En nuestros ensayos el tratamiento de los eritrocitos con neuroaminidasa permite detectar mayor número de células formadoras de rosetas. Por otra parte, si tenemos en cuenta que la mayoría de los linfocitos circulantes son células T (Ailute, F, 1974) y que la linfopenia es considerada como alteración constante en la PPA, parece lógico pensar que sean más afectadas las células que se encuentran en mayor proporción (linfocitos T).

La capacidad funcional de los linfocitos T fue valorada mediante la inducción blástica con PHA, dada la acción selectiva de este mitógeno. para este tipo de células, Coombs et al. (1970) Greaves et al, (1972). Los linfocitos B se analizaron también mediante la inducción blástica, utilizando LPS, ya que este antígeno presenta acción selectiva para este tipo de células, Fornet et al, (1974).



y Coutinho (1978).

Los resultados de estos trabajos demuestran que las células T presentan una marcada inmunosupresión, en contraste con los índices blásticos obtenidos en las células B, las cuales presentan valores prácticamente normales. El grado de inmunosupresión guarda relación con la virulencia del virus y la edad del animal, siendo observados los valores más bajos en las infecciones con virus de alta virulencia y en los animales de corta edad.

Respecto a los estudios comparativos con la PPC, merece destacarse que, si bien en ambos casos se produce leucopenia con linfopenia, en el estudio de la capacidad funcional de los linfocitos T y B frente a los mitógenos específicos se demostró, en nuestros ensayos, diferencias significativas entre la PPA y la PPC. El virus de la PPC afecta principalmente a las poblaciones celulares sobre las que actúa el mitógeno LPS, mientras que no parece afectar a las células sobre las que actúa el mitógeno PHA. El virus de la PPA, por el contrario, afecta a las poblaciones celulares que responden al mitógeno PHA, en tanto que no afecta a las células que responden al mitógeno LPS.

En cuanto a la respuesta blástica inducida por el antígeno de PPA, los resultados han puesto en evidencia tres tipos de comportamiento inmunológico en función de la virulencia del virus y de la edad de los animales:

1º.- La respuesta observada en los cerdos adultos inoculados con el virus España 75 (parcialmente atenuado), en los cuales el índice blástico fue muy bajo.

2º.- La respuesta de los animales adultos inculados con los virus de baja virulencia (RD y Br), que presentaron índices blásticos muy superiores a los anteriormente mencionados a partir de los 12 días PI y, aumentando progresivamente hasta el

acrificio.

39.- La respuesta de los animales adultos inoculados con los virus de alta virulencia (Esp 79 y Lis 60), así como de los lechones inoculados con los virus de baja y alta virulencia, en los cuales no se detectó blastogénesis.

Las diferencias en la intensidad de estos tres tipos de respuesta inmunológica podrían estar relacionadas con el grado de alteración de la capacidad funcional del linfocito T, dado que este tipo de células es el que responde mayoritariamente a la estimulación blástica por el antígeno, de acuerdo con los trabajos de Leguit et al, (1973).

La falta de estimulación blástica en la respuesta 3 podría ser explicada también por la acusada disminución del número y la función de los linfocitos T, observada en estos animales. Si mismo, sería un factor condicionante de esta falta de respuesta, la muerte del animal antes de los 12 días PI, período mínimo en nuestros ensayos para el reconocimiento del antígeno por los linfocitos T.

La aparente falta de correlación entre la capacidad funcional disminuida de los linfocitos T y los niveles relativamente altos de anticuerpos encontrados entre los 6 y 8 días de post-infección, sugiere que dichos anticuerpos pudieran estar inducidos sin la cooperación de las células T, como se ha podido observar en otras enfermedades víricas, Mochizuky et al, (1977), o con la participación de células T cooperadoras (T helper) no afectadas..

Al relacionar la sobrevivencia de los animales con la respuesta inmune, se observó como, generalmente, los cerdos sobrevivientes presentaban niveles de anticuerpos superiores a los que murieron, así como la respuesta funcional de los linfocitos T B de los primeros era también muy superior. Existía pues, una

aparente correlación entre ambos parámetros. Sin embargo, tres cerdos que sobrevivieron a la infección, presentaban una respuesta humoral muy baja, siendo normal su respuesta celular. Resulta dos similares han sido puestos de manifiesto por Ruiz Gonzalvo et al, (1981), el cual observó como animales inoculados con virus atenuados de PPA y reinfectados con el homólogo virulento, podían sobrevivir a estas infecciones a pesar de presentar niveles muy bajos de anticuerpos.

Actualmente todavía queda oscuro el mecanismo de la supervivencia de los animales con niveles muy bajos de anticuerpos o en ausencia total de ellos, pero el mantenimiento de la respuesta celular observado en nuestros trabajos sugiere la participación de ésta en la defensa contra el virus.

Los estudios de fagocitosis llevados a cabo en los grupos de experimentos I y II, demostraron la existencia de un gran paralelismo en los resultados obtenidos con todos los cerdos inoculados, a pesar de las diferencias víricas en los inóculos utilizados. Se observó como la capacidad fagocítica, monitorizada mediante la ingestión de partículas de Latex y la liberación enzimática, se encontraba afectada de forma muy significativa en el monocito durante la infección con los diferentes virus estudiados en este trabajo, independientemente del grado de virulencia en éstos. No obstante, la severidad de la inmunosupresión fagocítica en el monocito presenta una relación paralela con la virulencia del virus inoculado. Así, fue más severa en los cerdos inoculados con los virus Esp. 79 y Lis. 60, que en los inoculados con los virus Brasil, República Dominicana. Por el contrario ningún tipo de alteración en la capacidad fagocitaria y funcional del Polimorfonuclear neutrófilo en ninguno de los cerdos inoculados con los diferentes virus, manteniéndose valores siempre semejantes a los basales y animales control.

Los resultados observados en estos estudios de fagocitosis del monocito se correlacionan con la acción del virus

sobre ésta célula por las que el virus tiene un tropismo selectivo. Se conocía desde los trabajos de Malmquist y Hay, (1960), que los monocitos son seriamente afectados por el VPPA, en los cuales el virus se replica y produce efecto citopático. Esta acción del VPPA sobre los monocitos también ha sido descrita por Wardley y Wilkinson, (1977), y por Enjuanes et al, (1977), utilizando este último autor monocitos de diferentes especies animales.

Todos estos datos se correlacionan a su vez con lo observado por nosotros en los estudios sobre la infección "in vitro" de los PMN y M-M con virus de PPA. En estos trabajos se ha podido demostrar como el virus se replica en los M-M produciéndose efecto citopático. Por el contrario, no hay ninguna evidencia sobre posibles acciones del virus en los PMN.

Quizá sea también interesante destacar que en los estudios de fagocitosis no se pudieron encontrar cantidades detectables de glucoronidasa, mediante la técnica descrita por Brittinger et al., (1968), ni en los monocitos ni en los polimorfonucleares neutrófilos de ninguno de los cerdos analizados en estos experimentos. Por lo que al parecer, esta especie animal no debe tener cantidades mesurables de esta enzima.

En el área de la Inmunopatología, los datos obtenidos en los cerdos estudiados en este trabajo demuestran una disminución en los niveles del complemento circulante. Esta disminución está correlacionada a su vez con la presencia de inmunocomplejos de depósito en riñón formados por antígeno e IgG así como por C3. La aparición de estos inmunocomplejos podría estar motivada por la presencia simultánea de virus y anticuerpos.

La disminución del complemento en el torrente circulatorio es debida a la reacción de sus diferentes componentes con los inmunocomplejos, tanto circulantes como de depósito. La disminución del complemento circulante ha sido también descrita por Cochrane et al., (1973) en otros modelos de enfermedades virales.

cas. Por otra parte el descenso de los niveles de complemento circulante también coincide con la aparición de reacciones del antígeno del VPPA con la IgE que se encuentra en la superficie del basófilo dando lugar a la liberación del Factor de Agregación plaquetaria y aminas vasoactivas.

Con el fin de poder estudiar la existencia de aminas vasoactivas a través de las reacciones inmunológicas del antígeno de VPPA se utilizó el modelo de anticuerpos unidos a la superficie del basófilo. En la mayoría de las especies el tipo de anticuerpo que se encuentra unido a esta célula es de la clase IgE o alguna subclase de IgG. Dado que los leucocitos utilizados en nuestros estudios fueron lavados intensamente para evitar la presencia de cualquier anticuerpo que no estuviera unido a la superficie celular, inmunocomplejos circulantes, factores de coagulación, o cualquier otra proteína del suero con capacidad de respuesta, se puede admitir que las moléculas presentes en la superficie celular deberían ser exclusivamente inmunoglobulinas de la clase IgE.

Aunque, en la especie humana se ha podido demostrar que los macrófagos y neutrófilos liberan PAF sin necesidad de reacciones inmunológicas, Sánchez Crespo et al, (1980), en el caso del basófilo la activación tiene que ser necesariamente inmunológica, es decir, reacción del antígeno con las inmunoglobulinas de su superficie para que la degranulación se produzca y por tanto la liberación de PAF.

La reacción de liberación de PAF observada en este trabajo sugiere que los cerdos infectados con el VPPA producen IgE específica frente al antígeno que se une a la superficie de los basófilos, liberando estos últimos los mediadores de acción vasoactiva y, más concretamente el citado PAF, el cual agrega las plaquetas que a su vez liberan grandes cantidades de serotonina tal como ha sido demostrado en este trabajo. Este mecanismo se ha descrito como un factor importante para el depósito de inmunocom

plejos, Benveniste et al, (1974).

Es importante destacar el paralelismo entre la liberación de PAF, la aparición de los inmunocomplejos renales y la disminución del complemento circulante. Estos fenómenos aparecían más evidentes entre la cuarta y quinta semana PI. En el glomérulo, además de la ya mencionada IgG y C3, aparecía antígeno viral, aunque no se observaron lesiones histológicas de glomerulonefritis, quizás debido al corto período de tiempo transcurrido. Estudios realizados por Oldstone et al, (1971 y 1972), también han evidenciado, en otras enfermedades víricas, la presen-cia de inmunocomplejos de depósito sin lesiones histológicas de glomerulonefritis.

Los inmunocomplejos observados en el transcurso de estos experimentos se asemejan a los descritos por N. Cheville et al, (1970), en la infección experimental de PPC.

## V. CONCLUSIONES

- 1.- En todos los animales infectados con los virus utilizados en este trabajo, se confirmó la presencia simultánea de viremia y anticuerpos específicos de la clase IgG.
- 2.- En los cerdos adultos inoculados con los virus de la República Dominicana y Brasil se observó IgM específica a los 4 y 8 días PI, no siendo detectada ésta inmunoglobulina en los cerdos adultos inoculados con las cepas Lisboa 60 y España 79, como tampoco en los lechones.
- 3.- Las diferencias del grado de virulencia entre las cuatro cepas ensayadas, solamente pudieron ponerse en evidencia en los cerdos adultos, mientras que en los lechones todas se comportaron como cepas de alta virulencia.
- 4.- La aparición de leucopenia linfocítica fué constante en todos los animales inoculados, siendo mayor su intensidad en los cerdos infectados con los virus de alta virulencia.
- 5.- En todos los ensayos realizados con los diferentes virus, la linfopenia afectó con mayor intensidad a los linfocitos formadores de roseta (células T) que a los linfocitos con inmunoglobulinas de superficie (células B).
- 6.- La capacidad funcional de los linfocitos T y B, medida por la respuesta blástica inducida por mitógenos (Fitohemaglutinina y Lipopolisacárido), presentó una marcada supresión en las células T, conservándose normales los valores de las células B.
- 7.- La intensidad de la inmunosupresión a nivel de las células T observada en la respuesta blástica con Fitohemaglutinina fué más acusada en los cerdos inoculados con las cepas de mayor virulencia.
- 8.- Los linfocitos de los cerdos inoculados con los virus de ba

ja virulencia, presentaron respuesta blástica positiva con el antígeno de PPA, mientras que dicha respuesta blástica no se observó en los linfocitos procedentes de cerdos inoculados con las cepas de alta virulencia.

- 9.- En los cerdos supervivientes a la inoculación con cepas de baja virulencia o virus atenuado, la inmunosupresión de la respuesta blástica fué notablemente menos acusada que en los cerdos que murieron a consecuencia de la infección con cepas de alta virulencia. Así mismo, la respuesta humoral específica (IgM e IgG) fué también mayor en los supervivientes.
- 10.- La capacidad fagocítica de los monocitos de cerdos infectados con los diferentes virus de PPA ensayados se encontró muy disminuida, en tanto que dicha función se conservó normal en los polimorfonucleares neutrófilos.
- 11.- Los niveles de complemento circulante disminuyeron ostensiblemente en los cerdos inoculados con el virus atenuado (España 75) entre las 2 y 3 semanas PI, pasando de valores basales de 100-150 unidades CH50/ml. a 30-70 unidades CH50/ml.
- 12.- En la infección de la PPA se demostró la presencia de IgE específica y liberación de altos niveles del Factor de Agregación Plaquetaria.
- 13.- En los ensayos con el virus de la PPA atenuado, la infección se acompañó de depósitos de inmunocomplejos (IgG + C3 + Ag) a nivel de los glomérulos del riñón, sin alteraciones histológicas en la fase evolutiva analizada.



## VI. RESUMEN

En esta tesis se han estudiado algunos de los parámetros más importantes de la respuesta inmune durante la infección con diferentes virus de la Peste Porcina Africana. Los trabajos fueron en caminados a cubrir diversos aspectos de la respuesta humoral, celular e inmunopatología que no habían sido analizados hasta la fe cha en esta enfermedad del cerdo.

Los virus de PPA estudiados fueron España 75, parcialmente atenuado, Lisboa 60, España 79 (de alta virulencia) y los aislados de Brasil y República Dominicana (de baja virulencia). Así mismo, un grupo de animales fue inoculado con el virus de la Peste Porcina Clásica para poder estudiar paralelamente las posibles diferencias entre las dos Pestes del cerdo.

Los animales utilizados en los diferentes experimentos fueron cerdos adultos con pesos comprendidos entre los 40 y 45 kg y lecho nes extraídos mediante cesárea y mantenidos en ambiente estéril sin alimentar con calostro materno.

La infección con los diferentes inóculos víricos se realizó si multáneamente por vía oral e intranasal y las muestras de sangre para los distintos análisis fueron tomadas en el día cero (antes de la inoculación) y cada 4 o 7 días, según el experimento. En todos los grupos de animales se estudió la evolución clínica de la infección y la presencia de virus en sangre.

En el área de la respuesta humoral se determinó el nivel de las inmunoglobulinas IgG e IgM específicas del virus de la PPA mediante la inmunofluorescencia indirecta y el enzímoinmunoensayo, así como la valoración indirecta de la IgE específica por medio de la liberación del Factor de Activación de las Plaquetas.

Los aspectos de la respuesta de base celular estudiados fueron la cuantificación de leucocitos y linfocitos totales, así como la identificación y cuantificación mediante los receptores específicos, de las subpoblaciones de linfocitos T y B. Se valoró la ca-

pacidad funcional de los linfocitos T y B por la inducción blástica específica frente al antígeno de PPA e inespecífica con mitógenos. Simultáneamente se valoró la capacidad fagocítica "in vitro" de los monocitos y polimorfonucleares neutrófilos, de los diferentes animales, mediante la ingestión de partículas de Latex y Zymosan y la valoración de las enzimas específicas liberadas. Dentro de esta misma área se estudió la infección "in vitro" con el virus de la PPA de poblaciones parcialmente purificadas de linfocitos, monocitos y polimorfonucleares neutrófilos obtenidos de cerdos normales control.

En el área de la inmunopatología se estudiaron los niveles de complemento circulante y la liberación del Factor de Agregación de las Plaquetas. Esta última determinación se realizó mediante la reacción del antígeno de la PPA con la IgE de los basófilos. Por último y también dentro de esta área se detectaron inmunocomplejos de depósito en el riñón de varios cerdos. Los cortes renales fueron teñidos con sueros de conejo, marcados con fluoresceína, anti IgG y C<sub>3</sub> porcino así como anti virus de la PPA.

Los resultados de las inoculaciones de animales jóvenes con cepas de alta y baja virulencia para los cerdos adultos demostraron que en los lechones todas las cepas ensayadas presentaron alta virulencia sin ninguna diferencia de patogenicidad entre ellas.

En el área de respuesta humoral se confirmó la presencia simultánea en sangre de IgG y virus. De otra parte fue detectada la presencia de IgM específica a los 4 y 8 días PI en los cerdos adultos inoculados con las cepas Brasil y República Dominicana. La reacción del antígeno de la PPA con los leucocitos polinucleares basófilos a nivel de membrana celular sugieren la presencia de IgE específica.

En el área de la respuesta inmunitaria de base celular se confirmó la presencia de leucopenia linfocítica y fue determinado que la intensidad de la mencionada leucopenia estaba en estrecha

relación con el grado de virulencia del virus inoculado. Así mismo fue establecido que la linfopenia se debía a la disminución de los linfocitos T. Funcionalmente también fue observada una mayor inmunosupresión en los linfocitos T que en los B. Los resultados de los estudios de la capacidad fagocítica del monocito y polimorfonuclear demostraron la disminución de la capacidad fagocítica del monocito, mientras que no se observaban cambios de importancia en el polimorfonuclear neutrófilo. Estos hallazgos funcionales de la capacidad fagocítica fueron ampliados con el estudio de la infección "in vitro" de las células fagocíticas con el virus de la PPA comprobándose el gran paralelismo entre ambos resultados.

Fue establecido cierto grado de relación entre la respuesta humoral y celular en las infecciones estudiadas, así como el paralelismo existente entre ambas respuestas y la sobrevivencia a la infección con los distintos virus ensayados.

De los estudios en el área de la inmunopatología caben destacar los hallazgos de la disminución del complemento circulante y el aumento importante del Factor de Activación de las Plaquetas. Estas modificaciones coincidieron con la presencia de inmunocomplejos de depósito de IgG, de C<sub>3</sub> y de antígeno viral en el riñón de los animales estudiados, si bien no fue observada ninguna lesión histológica, a nivel renal, en el período evolutivo analizado.

## VII - BIBLIOGRAFIA

- ADLINGER, H.K., STONE, S.S., HESS, W.R., BACHRACH, H.L. (1966)  
Extraction of infectious deoxyribonucleic acid from African swine fever virus. *Virology*, 30, 750-752.
- AIUTI, F. (1974). Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. *Scand. J. Immunol.* 3 521-532.
- ALLISON, A.C. (1971). Immunity against viruses. Scientific basis of medicine. Athlone Press edit. (p49) London.
- ALLISON, A.C. (1972). Immunity and Immunopathology in virus infections. *Ann. Inst. Pasteur* 123, 585-608.
- ALLISON, A.C. (1974). Macrophage studies on virus infections. *Progr. Med. Virol.* 18, 15-25.
- ANDERSON, J.O., SJOBERG J., MOLLER G. (1972). Mitoben as probes for immunocyte activation and celular cooperation. *Transplantn. Bull*, 11, 131-135.
- ASTER, R.H., JANDL, J.H. (1964). Platelet sequestration in man. *Methods J. Clin. Investigation.* 43, 843-846.
- BENVENISTE, J. (1974). Platelet-activating factor: A new mediator of anaphylaxis and immune complex deposition from rabbit and human basophils. *Nature (Lond)* 249, 581-583.
- BENVENISTE J., CAMUSSI, J., POLONSKIY, J. (1977). Platelet-activating factor. *Monogr. Allergy* 12: 138-142.
- BENVENISTE, J., HENSON, P.M., COCHRANE, CLG. (1972). Leukocyte dependent histamine release from rabbit platelets: The role of IgE basophils and a platelet-activating factor. *J. Exp. Med.* 1356-1372.

- BINNS, R.M., SYMONS, D.B.A. (1974). The ontogeny of lymphocyte immunoglobulin determinants and their relationship to antibody production in the foetal pig. Res. Vet. Sci. 16, 260 - 262.
- BINNS, R.M., TONKING, C.H. (1974). Receptor for bound immunoglobulin Fc on a pig lymphocyte subpopulation. IRCS Med. Sci. 2, 1437-1441.
- BINNS, R.M. (1978). Sheep erythrocyte rosettes in pigs, sheep, cattle, and goats demonstrated in presence of dextran. J. Immunol. Methods 21, 197-205.
- BLACK, D.N., BROWN, F. (1976). Purification and physicochemical characteristics of African swine fever virus. J. Gen. Virol. 32, 509-518.
- BLOOM, B.R., LANDY M., LAWRENCE H.S., (1976). In vitro methods in cell Mediated Immunity. Cell Immuno, 6, 331-336.
- BOOL, P.H., ORDAS, A., SANCHEZ BOTIJA, C. (1969). El diagnóstico de la Peste Porcina Africana por Immunofluorescencia. Bull. Off. Int. Epiz. 72, 819-839.
- BOMMELI, W., KIHLM, W., EHRENSPERGER, F. (1981). Preliminary Studies of pigs immunizations against ASF. Consulta FAO/ECE de Espertos. Cerdeña (Italia). Septiembre.
- BOULANGER, P., BANNISTER, G.L., GRAY, D.P., RUCKENBAUER, G.M., WILLIS, N.G. (1967). Demonstration of the viral antigen by means of immunofluorescence. Can. J. Comp. Med. 31, 16-23.
- BRAIN, P., GORDON, J., WILLETTS, W.A. (1971). Rosette formation by peripheral lymphocytes. Clin. Exp. Immu. 6, 681-688.
- BREESE, S.A., DE BOER, C.J. (1966). Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. Virology 28, 420-428.

- BRITTINGER G., HIRSCHHORN R., DOUGLAS SD. (1968). Studies on lysosomes. XI. Characterization of a hydrolase-rich fraction from human lymphocytes. J. Cell Biol. 37, 394-411,
- BROWN, F., GRAVES, J.H. (1959). Immunoglobulin detection during a foot and mouth virus infections. Nature (London) 183, 1688 - 1692.
- BUSCHMANN, H., PAWLAS, S. (1980). A study of Porcine Populations II-Characterization of Porcine Lymphocyte populations. Veterinary Immunology and Immunopathology 1, 225-241.
- CHANG, T.W., WEINSTEIN, L., MC MAHON, H.E. (1966). Paralytic poliomyelitis in a child with hypogammaglobulinaemia: probable implication of type 1 vaccine strain. Pediatric 37, 630-635.
- CHEVILLE, N.F., MENGELING, W.L., SINOBER, M.R. (1970). Ultrastructural and immunofluorescent studies of glomerulonephritis in chronic hog cholera. Lab. Invest. 22, 458-467.
- COCHRANE, C.G. (1963). Studies on the localization of antigen antibody complexes and other macromolecules in vessels. I. Structural studies. J. Exp. Med. 118, 489-502.
- COCHRANE, C.G. (1963). Studies on the localization of antigen antibody complexes and other macromolecules in vessel walls. II Pathogenetic and pharmacodynamic studies. J. Exp. Med. 118, 503-517.
- COCHRANE, C.G., KOFFLER, D. (1973). Immune complex disease in experimental animals and man. Adv. Immunol. 16, 185-264.
- COGGINS, L., MOUTON, J.E., COLGROVE, G.S. (1968). Studies with Hinde attenuated ASFV. Cornell Vet. 1, 525-540.
- COOMBS RRA., GURNER BW., JANEAWAY CA JR, (1970). Immunoglobu -

lin determinants on the lymphocytes of normal rabbits. I. Demonstration by the mixed antiglobulin reaction of determinants recognized by anti-8 anti-u, anti-Fab and anti-allotype sera, anti-A54 and A56. *Immunology* 18, 417-429.

- COOPER, M.D., CHASE, H.P., LOWMAN, J.T., KRIVITL, W., GOOD, R.A. (1968), Wiskotl-Aldrich Syndrome. An immunologic deficiency disease, involving the afferent limb of Immunity. *Am. J. Med.* 44, 499-508.
- COWAN, K.M. (1961). Immunological studies on ASFV. I) Elimination of the procomplementary activity of swine serum with formalin. *J. Immunology* 86, 465-470.
- DE BOER, C.J. (1967). Studies to Determine Neutralizing Antibody in sera from Animals Recovered from African Swine Fever and Laboratory Animals Inoculated with African Virus with Adjuvants. *Archiv für Die Gesamte Virusforschung* 20, 164-179.
- DE BOER, C.J., HESS, W.R., DARDIRI, A.H. (1969). Studies to determine the presence of neutralizing Antibody in Sera and Kidneys from swine recovered from African swine fever. *Archiv für die gesamte virusforschung* 27, 44-54.
- DE BOER D.J., PAN, I.C., HESS, W.R. (1972). Immunology of African Swine Fever. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 160, 528-532.
- DE TRAY, D.E. (1957). Persistence of viremia and immunity in African Swine Fever. *Am. J. Vet. Res.* 18:811-816.
- DE TRAY, D.E. SCOTT, G.R. (1957). Blood Changes in Swine with African Swine Fever. *Am. J. Vet. Res.*, 68, 484-490.
- ENJUANES L., CUBERO I., VIÑUELA E. (1977). Sensitivity of macrophages from different species to African swine fever (ASF) virus. *J. Gen. Virol.* 34: 455-463.

- ENJUANES, L., CARRASCOSA, A.L., VIÑUELA, E. (1976). Isolation and properties of the DNA of African swine fever virus. J. Gen Virol. 32, 479-492.
- ESCAJADILLO, C., BINNS, R.M. (1975). Rosette Formation with sheep Erythrocyte. A possible T cell marker in the pig. Int. Arch. Allergy. Appl. Immunolo. 48, 261-275.
- FORNI, L., COUTINHO, A. (1978). An antiserum which recognizes lipopolysaccharide-reactive B cells in the mouse. Eur. J. Immunol. 8, 56-62.
- GRANT, C.K. (1977). Complement "Specificity" and interchangeability: Measurement of hemolytic complement levels and use of the complement-fixation test with sera from common domesticated animals. Am. J. Vet. Res. 38, 1611-1617.
- GREAVES MF., JANOSSEY G. (1972). Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cells surface bindings ligands-Transplant Bull. 11, 87-95.
- HAAG, J., LARENAUDIE, R., GONZALVO, F. (1965). Peste Porcina Africaine. Action de la 5-Iodo-4-deoxyuridine sur la culture du virus in vitro. Bull Off. Inter. Epiz. 63, 717-722.
- HENSON, P.M. (1976). Activation and desensitization of platelets by platelet-activating factor (PAF) derived from IgE-sensitized basophils. I. Characteristics of the secretory response J. Exp. Med. 143, 937-952.
- HENSON, P.M. (1977). Activation of rabbit platelets by platelet activating factor derived from IgE sensitized basophils. II. Characteristics of the aggregation and its dissociation from secretion. J. Clin. Invest. 60, 481-490.
- HENSON, P.M., PINCKARD, R.M. (1977). Platelet activating fac -



tor. A possible direct mediator of anaphylaxis in the rabbit and a trigger for the vascular deposition of circulating immune complexes. *Mongr. Allergy* 12, 13-26. \

- HESS, W.R., PAN, I.C. (1977), In Agricultural Research Seminar on Hog Cholera/Classical Swine Fever and ASF. Hannover Sept. 1976. Directorate-General XIII pp 602-611.
- HIGGINS, D.A., (1981), Markers for T and B lymphocytes and their application to animals. *Veterinary Bulletin* 51 (12), 925-963.
- KATZ, D.H. (1977), Lymphocyte Differentiation, Recognition and Regulation. Academic Press, N.Y.
- KIM, Y, B. (1974), Sheep erythrocyte rosette formation by swine lymphocytes: a marker for T. cell. *Fedn Proc.* 33, 766-672.
- KNICKER, W.T., COCHRANE, C.G. (1968), The localization of circulating immune complexes in experimental serum sickness. The role of vasoactive amines and hydrodynamic forces. *J. Exp. Med.* 127, 119-136.
- KRETSCHMER, R., AUGUST, C.S., ROSEN, F.S., SANEWAY, C.A. (1969). Recurrent infections, episodic lymphopenia and impaired cellular immunity. *New England, J. Med.* 281, 285-290.
- LAGOTENT, A., BANDALI, K., HAWKINS, A. (1978), Differentiation of human T cells by a Esterase staining. *Fedn. Proc.* 42, 321 - 327.
- LEGUIT, P., MEINESZ, A, HISMANS, L, (1973), The use of an antigen cocktail in the lymphocyte transformation test. *Clin. Exp. Immunol.* 14, 149-152.
- LINDHARDT, K., WALTER, K., BERNEYER, HV. (ED) (1965). *Methods of Enzymatic Analysis*. New York, Academic Press Inc. p 776.

LUX, S.E., JOHNSTONG, R., AUGUST, C.S., SAY, B., PENCHASZADEH, V., ROSEN F., MC KUSICK, V.A. (1970). Chronic neutropenia and abnormal cellular immunity in cartilage-hair hypoplasia. New. England. J. Med. 282, 231-236.

MALMQUIST, W.A., HAY, D. (1960). Hemoadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. Am.J. Vet. Res. 21 : 104-108.

MALMQUIST, W.A. (1963). Serology and Immunology studies of African Swine Fever. Am.J. Vet. Res. 24 (100), 450-459.

MANSO RIBEIRO, J., NUNES, J.L., LOPES, F., ET-SOBRAI, M., (1963). Vaccination contre la Peste Porcine Africaine. Bull. Off. int. Epiz, 60, 921-937.

MARKER, C.S., ASHER, J.M. (1976). Specific in vitro lymphocyte transformation with venezuelan Equine Encephalitis virus. Cell Immunol, 23, 32-37.

MAYER, M. (1961). Complement and complement fixation. In, Kabat E.A.; Mayer, M. Experimental Immunochemistry ch. 4, pp. 133-240 C.C. Thomas, Springfield, III.

MEBUS, C.A., DARDIRI, A.H.,HAMDY, F.M. (1979). Some characteristics of ASF viruses isolated from Brazil and the Dominican Republic. In Proceeding 82 rd Annu. Meet., US. Anim.Health Assoc. 232-236.

MEBUS, C.A.,DARDIRI, A.H. (1980). Additional characteristics of disease caused by African Swine Fever viruses isolated from Brazil and the Dominican Republic. In proceeding, 83 rd. Annu Mett., US Anim. Health Assoc. 227-239.

MEBUS, C.A. (1981). Comparison of the Pathology of high and low virulence African Swine Fever viral infections. International

EEC/FAO ASF meeting. Sardinia. Sep 1981.

- MAC VICAR, J.W., MEBUS, C.A., BECKER, N., BELDEN, R.C., GIBBS E.P. (1981). Induced African Swine Fever in Feral Pigs. J.A.V. M.A. 179 (5), 441-446.
- MILLER, M.E., SCHIEKEN, R.M. (1967). Thymic dysplasia. A separable entity from Swiss agammaglobulinaemia. Amer. J. Med. Sci. 253, 741-750.
- MOCHIZUKI, D., HEDRICK, S., WATSON I. (1977). The interaction of herpes simplex virus with murine lymphocytes. I. Mitogenic properties of herpes simplex virus. J. Exp. Med. 146, 1500 - 1510.
- MORENO LOPEZ, J. (1977). Cell-Mediated Immunity to PIV-3 in Cattle. Evaluation of in vivo and in vitro test. Zbl. Vet. Med B, 24, 231-240.
- MOULTON, J.E., COGGINS, L. (1968). Comparison of lesions in acute and chronic African Swine Fever. Cornell Vet. 58, 364-388.
- NACHMAN, R.L., WEKSLER, B. (1972). The platelet as an inflammatory cell. An NY Acad Sci. 201, 131-137.
- O'CONNELL, C.J., KARZON, D.T., BARROW, A.L., PLANT, M.E. ALI, U.M. (1964). Progressive vaccinia with normal antibodies: a case possibly due to deficient cellular immunity. Ann. Int. Med. 60, 282-285.
- OLDSTONE, M.B.A., DIXON, F.J. (1971). Immune complex disease in chronic viral infections. J. Exp. Med. 134, 32s-40s.
- OLDSTONE, M.B.A., TISHON, A., TONIETTI, G., DIXON, F.J. (1972). Immune complex disease associated with spontaneous murine leukemia: Incidence and pathogenesis of glomerulonephritis. Clin. Immunol. Immunopathol, 1, 6-14.

- OLGRA, P.K., MORAG, A., TIKU, M. (1975). Viral Immunology and Immunopathology. Chapter 14, 57-74. Ed, A.L. Notkins. A. Press.
- PAN, I.C., DE BOER, C.J., MENSCHLE, W.P. (1970). Hypergamma - globulinaemia in Swine Infected with African Fever Virus. Procc. Soc. Exp. Biol. Med. 134, 367-371.
- PERNIS, B. FORNI, L., LUZZATI, A.L. (1977), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 175-185.
- PLOWRIGHT, W., BROWN, F., PARKER, J. (1966). Evidence por type of nucleic acid in African swine fever virus. Arch. ges. Virusforsch, 19, 289-304.
- PORTER, P., ALLEN, W.D. (1972), Classes of immunoglobulins re - lated to immunity in the pig. j.a.v.m.a. 160 (4), 511-518.
- RAGER-ZISMAN, B., ALLISON, A.C. (1973). The role of antibody and host cells in the resistance of mice against Coxackie B-3 virus. J. Gen. Virol. 19, 329-334.
- RAGER-ZISMAN, B., ALLISON, A.C. (1976). Mechanism of immunologic resistance to Herpes simplex virus 1 (HSV-1) infection. J. Immunol. 116, 35-40.
- RIGAL D.A., ELSASSER P., HECHT F., (1970). Imparied the in the vitro response of circulating lymphocytes to phytohemagglutinin in Down's Syndrome: Dose an time responser. Curves and Rela - tion to cellular Immunity. Int. Archs. Allergy, appl. Immun, 32, 587-593.
- RUIZ GONZALVO, F., CARNERO, M.E., Y BRUYEL, V. (1981). Respues - tas inmunológicas de cerdos a virus de la PPA parcialmente ate - nuados y su resistencia a virus homólogos y heterólogos virulen tos. Consulta FAO/EEL de Expertos. Sassari, Cerdeña, Septiembre 1981.

- SANCHEZ BOTIJA, C. (1963). Modificaciones del Virus de la PPA en cultivo celulares. Patogenicidad y Propiedades protectivas de las capas atenuadas. Rev. Pat. Biol. Animal. 7, 5-23.
- SANCHEZ BOTIJA, C. (1962). Estudios sobre la Peste Porcina - Africana en España. Bull. off. Int. Epiz., 58, 707-727.
- SANCHEZ BOTIJA, C. , SANCHEZ BOTIJA, R. (1965). Características actuales de Peste Porcina Africana en España. Reunión Internacional F.A.O.-O.I.E. sobre el cólera del cerdo y la peste porcina africana. Roma. 31 mayo - 5 junio, 1965.
- SANCHEZ BOTIJA, C., ORDAS A., GONZALES, J.C. (1970). Inmunofluorescencia aplicada a la investigación de anticuerpos de la Peste Porcina Africana. Rev. Patron Biol. Animal 14:159-180.
- SANCHEZ BOTIJA, C. , ORDAS ALVAREZ, A. (1980). Peste Porcina Africana. Monografía. Patología clínica del ganado porcino. Ediciones Neosan. 200, 119-154.
- SANCHEZ CRESPO, M., ALONSO, F., EGIDO J. (1980). Platelet-activating factor in anaphylaxis and phagocytosis. I. Release from human peripheral polymorphonuclears and monocytes during the stimulation by ionophore A23187 and phagocytosis but not from degranulating basophils. Immunology 40, 645-655.
- SANCHEZ-VIZCAINO, J.M., NORONHA, F., POCO, A. (1979). Estudios de inmunidad de base celular: Inducción blástica específica e inespecífica en linfocitos de gatos afectados por el Complejo Leucemia Sarcoma Felino. An. INIA/Ser.: Hig. Sanid. anim. 4, 45-55.
- SANCHEZ-VIZCAINO, J.M., MARTIN OTERO, L., ORDAS A. (1979). Adaptación y evaluación del Enzimo Immuno Ensayo para la detección de anticuerpos anti-PPA. Laboratorio 67, 311-329.

- SANCHEZ-VIZCAINO, J.M., TABARES, E., SALVADOR, E., ORDAS, A. (1981). Semipurified structural viral protein for the detection of ASF antibodies by indirect ELISA technique. C.E.C. - F.A.O. Expert Consultation on African Swine Fever Research. Sardinia 23-25, Septiembre 1981.
- SHIMIZU, M., PAN, I.C., HESS, W.R. (1976). T and B lymphocytes in porcine blood. Am. J. Vet. Res. 37, 309-317.
- SHIMIZU, M., PAN, I.C., HESS, W.R. (1977). Cellular immunity demonstrated in pigs infected with African swine fever virus. Am. J. Vet. Res. 38, 27-31.
- SYMONS, D.B.A., CLARKSON, C.A. (1980). Isoelectric heterogeneity of immunoglobulin secreted by LPS activated neonatal and adult pig lymphocytes in vitro. Immunology 41, 875-881.
- SYMONS, D.B.A., LAY, C.A. (1979). Immunoglobulin biosynthesis in vitro after stimulation of pig blood lymphocytes with mitogen. Int. Archs. Allergy. Appl. Imm. 57, 418-424.
- TABARES, E., SANCHEZ BOTIJA, C., (1979). Synthesis of DNA in cells infected with African swine fever virus. Arch. Virol. 61, 49-59.
- TABARES, E., MARCOTEGUI, M., FERNANDEZ, A., SANCHEZ BOTIJA, C. (1980). Proteins Specified by African Swine fever Virus I. Analysis of Viral Structural Proteins and Antigenic Properties. Arch. of Virology. 66, 107-117.
- TABARES, E., MARTINEZ, J., RUIZ GONZALVO, F., SANCHEZ BOTIJA, C. (1980). Proteins Specified by African Swine Fever Virus II. Analysis of Proteins in Infected Cells and Antigenic Properties. Arch. of Virology, 66, 119-132.
- TABARES, E., MARTINEZ, J., RUIZ-GONZALVO, F., CARNERO, M.E.,

MARTIN, E., SANCHEZ BOTIJA, C. (1981). Synthesis of proteins in cells infected with African Swine Fever Virus. V International Congress of Virology. Strasbourg. France.

- TABARES, E., FERNANDEZ, M., SALVADOR, E., CARNERO, M.E., SANCHEZ BOTIJA, C. (1981). A reliable ELISA with the major structural protein of African Swine Fever Virus. Arch. of Virology. 70, 297-300.
- TABARES, E., FERNANDEZ, M., SALVADOR, E., CARNERO, M.E., SANCHEZ BOTIJA, C., (1981). Proteins especificied by African Swine Fever Virus III. Antigeenic properties of VP 73. C.E.C.-F.A.O. Expert Consultation on African Swine Fever Research. Sardinia 23-25, Septiembre 1981.
- VALERO, F., SANCHEZ-VIZCAINO, JM. (1982). Purificación de las diferentes poblaciones del sistema inmune del cerdo: Estudio comparativo de varias técnicas. Ann. INIA Serie Ganadera 14, 69-81.
- VIGARIO, J.D., CASTRO PORTUGAL, F.L., FERREIRA, C.A., FESTAS, M.B. (1977). Purification and study of the structural polypeptides of African swine fever virus. Hog cholera, classical swine fever and African swine fever. C.E.C.-EUR 5904, EN, 469-482.
- WAALKES, T.P., COBURN, H. (1959). The role of platelets and the release of serotonin and histamine during anaphylaxis in the rabbit. J. Allergy 30, 394-407.
- WARDLEY, R.C., WILKINSON, P.J. (1977). The Association of African Swine Fever Virus with blood components of infected Pigs. Archives of Virology 55, 327-334.
- WARDLEY, R.C., WILKINSON, P.J. (1980). Lymphocyte responses to African swine fever virus infection. Res. Vet. Sci. 28, 185-194.

135

- WESLEY, R.D. PAN, I.C. (1981). Differentiation of VERO cell adapted African Swine Fever Virus isolates by restriction endonuclease analysis-C.E.E.-F.A.O.- Expert Consultation on African Swine Fever Research. Sardinia, 23-25, Septiembre 1981.



BIBLIOTECA